

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Bioquímica**



**ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES  
Th17 y Thf EN LA PATOGENIA  
DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

**Irene Arroyo Villa**

**Madrid, 2015**



**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Autónoma de Madrid**



**ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES**  
**Th17 y Thf EN LA PATOGENIA**  
**DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Memoria presentada por Irene Arroyo Villa, Licenciada en Ciencias Biológicas,  
para optar al grado de Doctor.

Directores:

Dra. María Eugenia Miranda Carús

Dr. Emilio Martín Mola

Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz), Madrid



**MARÍA EUGENIA MIRANDA CARÚS**, Doctora en Medicina,

Médico Adjunto del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

**EMILIO MARTÍN MOLA**, Doctor en Medicina,

Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Certifican, que Doña IRENE ARROYO VILLA, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Estudio de las poblaciones celulares Th17 y Thf en la patogenia de la artritis reumatoide”, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 30 de Octubre de 2015.

Fdo.: Dra. María Eugenia Miranda Carús

Fdo.: Dr. Emilio Martín Mola



Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz), Madrid. Se ha llevado a cabo mediante financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad: SAF 2009/07100 y FIS PI-13/00084, el Instituto de Salud Carlos III Programa RETICS: RD08/0075 (RIER) y RD12/0009/0012 (RIER) y la Comunidad Autónoma de Madrid: Fondo Europeo de Desarrollo Regional RAPHYME.





*A mis padres y a mi hermano*



*"No ganan siempre los buenos, ganan los que luchan"*

Diego Pablo Simeone



## ***AGRADECIMIENTOS***



Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. María Eugenia Miranda, codirectora de esta tesis, por confiar en mí desde el primer momento. Gracias por su dedicación, y paciencia, por haberme hecho recapacitar en los momentos de desánimo y por haberme hecho crecer como científica y como persona.

Asimismo agradezco a mi codirector el Dr. Martín Mola, por facilitar el desarrollo de esta tesis. Gracias al Dr. Balsa, por su atención, su disposición y por enseñarme que clínica y básica están condenadas a entenderse. A todo el servicio de Reumatología del Hospital La Paz: Laura, Pilar, Gema, Chami, Alex y Diana muy especialmente a las enfermeras M<sup>a</sup> Jesús y Mercedes por “pinchar” a todas mis víctimas y facilitarme el día a día con las muestras de sangre. A Lola, Adela, Ana y Camino, por ayudarme con las historias clínicas, las listas de consultas y todos esas pequeñas cosillas que ellas dominan a la perfección. Sin su colaboración este trabajo no habría podido llevarse a cabo, es un placer trabajar con todos ellos.

A todos los “controles sanos” en especial a mis chicas de citaciones, a las auxiliares de cirugía experimental, Isabel y Antonia, y a las compañeras de la limpieza, por estar dispuestos a donar sangre siempre que lo necesitaba.

A Belén, mi compañera en este largo viaje de la Tesis con la que he compartido tanto los buenos como los malos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Luisca e Inma, que me hacen las mañanas más llevaderas y con los que paso los momentos mas divertidos del día. Gracias al resto de personas que trabajan en la Unidad de Investigación del Hospital La Paz y que directa o indirectamente han contribuido a la realización de este trabajo. Después de compartir estos años con todos vosotros, sólo tengo palabras de agradecimiento por todos los momentos compartidos.

Quiero agradecer muy especialmente a *The Best of FIBHULP* (Julia, Miguel, Juanan, Mariana, Rocío y Lucía), mi gran familia científica, por todos los buenos momentos que hemos compartido: desayunos del Comité de Festejos, Cumpleaños, cenas porque si y sobretodo té y cafés con “algo dulce”. Mención especial para Carol y Ángelo por el cariño que me dais siempre, por estar ahí en cada momento sin esperar nada a cambio y dándome el tiempo que necesito. A la Dra. Aras, que fue quién me enseñó a hacer mis primeros pinitos científicos y con la que comparto mi gran afición por el Atleti. A mis *Chuminas 2.0* que llevan a mi lado desde que éramos unas adolescentes desmelenadas y con las que tantos buenos recuerdos he creado.

A mis padres y a Charlie, por vuestra confianza, generosidad e infinita paciencia. Me lo habéis dado todo y todo os lo debo a vosotros. Vuestro apoyo ha sido imprescindible para poder realizar y concluir este trabajo. A mi prima Sara, por estar siempre que la necesito y llevarme de la mano, por demostrarme que según cómo se mire, lo complicado puede ser realmente sencillo.

A mi pollito, por ser capaz de sacarme una sonrisa incluso en los momentos más difíciles, por estar siempre a mi lado y mostrarme su apoyo incondicional, con el tiempo te has convertido en un pilar fundamental de mi vida.





## ***RESUMEN/SUMMARY***



La artritis reumatoide (AR), es una enfermedad autoinmune sistémica, caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones, la destrucción del cartílago y las erosiones óseas. Numerosos estudios indican que la interleuquina 17 (IL-17) desempeña un papel importante en la patogenia de la AR. Ratones deficientes para IL-17 muestran una forma atenuada de artritis inducida por colágeno y el tratamiento con anti-IL-17 en este mismo modelo murino de AR, se asocia con una reducción significativa de la gravedad. En estudios en humanos, se han observado niveles altos de IL-17 en el líquido sinovial de pacientes con AR y se ha detectado la producción de IL-17 en células T CD4+ de la membrana sinovial de AR. Un porcentaje alterado de las células Th17 ha sido descrito en sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con AR, pero hasta la fecha los datos encontrados son contradictorios.

Por otro lado, las células B también participan en la patogenia de la AR a través de la producción de autoanticuerpos. Las células T helper foliculares (Thf), promueven la maduración de las células B y la producción de anticuerpos. Estas células juegan un papel importante en la autoinmunidad, se ha descrito un aumento del número células Thf en modelos murinos de artritis inflamatoria. Las células Thf clásicas se encuentran en los órganos linfoides secundarios. Varios autores han descrito poblaciones de células T CD4+CXCR5+ circulantes que muestran características fenotípicas y funcionales de células Thf. El aumento de la frecuencias de estos homólogos circulantes de células Thf (Thfc) se ha asociado con enfermedades autoinmunes. Recientemente, se han descrito subpoblaciones de células Thfc que se caracterizan y clasifican según la expresión diferencial de los receptores de quemoquinas CXCR3 y CCR6 en células T CD4+CXCR5+ y que muestran diferencias funcionales en cuanto a su capacidad de ayudar a los linfocitos B. Un equilibrio alterado de estas subpoblaciones de Thfc se ha asociado con la patogenia de varias enfermedades autoinmunes, pero hasta donde sabemos estas subpoblaciones no han sido estudiadas en AR.

Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue examinar la frecuencia y el fenotipo de las células Th17 en sangre periférica de pacientes con AR de reciente comienzo (ARo), y en líquido sinovial de pacientes con AR establecida. Observamos una disminución significativa de la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes en pacientes ARo ACPA+, que asciende hasta los valores observados en los controles, tras el inicio del tratamiento con metotrexato. La frecuencia basal de células Th17 circulantes se correlacionó significativamente con el título de ACPA y con la presencia o ausencia de erosiones basales.

Nuestro segundo objetivo era estudiar la frecuencia de las células Thfc, las subpoblaciones de Thfc y los plasmablastos circulantes, en pacientes con AR. Observamos que los pacientes con AR muestran una mayor frecuencia de células Thfc CD4+CXCR5+ICOS+ junto con una sobrerrepresentación de las subpoblaciones de células Thfc con fenotipo ayudador de linfocitos B. Por otro lado, sólo los pacientes con AR con enfermedad activa mostraban una mayor proporción de plasmablastos circulantes.

Rheumatoid Arthritis (RA), a systemic autoimmune disease, is characterized by chronic joint inflammation, cartilage destruction and bone erosions. Numerous experimental data indicate that interleukin 17 (IL-17) plays an important role in the pathogenesis of RA. IL-17 deficient mice demonstrate a markedly attenuated form of collagen-induced arthritis and anti-IL-17 therapy in this mouse model of RA is associated with a significant reduction of severity. In human studies, high levels of IL-17 have been observed in the synovial fluid of patients with RA and IL-17 producing CD4<sup>+</sup> T cells have been detected in RA synovial membranes. An altered percentage of Th17 cells has been described in the peripheral blood and synovial fluid of RA patients, but to date conflicting data have been reported.

On the other hand, B cells also actively participate in RA pathogenesis through the production of autoantibodies. Follicular helper T cells (T<sub>fh</sub>), promote B cell maturation and antibody production. T<sub>fh</sub> cells play an important role in the pathogenesis of autoimmunity, and increased numbers have been described in murine models of inflammatory arthritis. Classical T<sub>fh</sub> cells are located in secondary lymphoid organs. Several reports have subsequently described circulating populations of CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> T cells that display both phenotypic and functional features of true T<sub>fh</sub> cells. Increased frequencies of circulating T<sub>fh</sub> cell counterparts (cT<sub>fh</sub>) have been associated with autoimmune diseases. More recently, phenotypic and functionally distinct subpopulations of cT<sub>fh</sub> cells have been described, according to the differential expression of the chemoquine receptors CXCR3 and CCR6 on CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> T cells. An altered balance of these cT<sub>fh</sub> subsets is associated with the pathogenesis of autoimmunity but to our knowledge has not been investigated in RA.

Therefore, our first objective was to examine the frequency and phenotype of Th17 cells in the peripheral blood of early RA (eRA) patients, and in the synovial fluid of patients with established RA. We have observed a significantly decreased frequency of circulating Th17 and Th17/Th1 cells in ACPA<sup>+</sup> eRA patients that increase up to values observed in controls during follow-up after initiating treatment with methotrexate. The basal circulating Th17 frequency was significantly correlated with the titre of ACPA and with the presence or absence of basal erosions.

Our second objective was to study the frequency of cT<sub>fh</sub> and cT<sub>fh</sub> cell subsets together with the frequency of circulating plasmablast in patients with RA. We observed that RA patients demonstrate an increased frequency of cT<sub>fh</sub> CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> together with an overrepresentation of cT<sub>fh</sub> subsets bearing a phenotype associated with B cell helping capacity. In contrast, only RA patients with active disease show an increased proportion of circulating plasmablasts.

## ***ÍNDICE***



|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABREVIATURAS .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1. ARTRITIS REUMATOIDE.....  | 7         |
| 1.1 Células efectoras que participan en la patogenia de la AR.....   | 8         |
| 1.2 Biomarcadores en la AR .....   | 10        |
| 1.2.1 Citoquinas.....  | 11        |
| 1.2.2 Autoanticuerpos.....   | 12        |
| 2. LINFOCITOS T CD4+ .....   | 16        |
| 2.1 Linfocitos Th17.....   | 18        |
| 2.2 Linfocitos Thf. ....   | 21        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>31</b> |
| 1. PACIENTES .....   | 33        |
| 1.1 Características de los pacientes con AR que donaron sangre periférica y líquido sinovial para obtener linfocitos T en el estudio de linfocitos Th17 .....                      | 33        |
| 1.2 Características de los pacientes con AR que donaron sangre periférica para obtener linfocitos T en el estudio de linfocitos Thf.....   | 34        |
| 2. CULTIVOS CELULARES .....  | 35        |
| 2.1 Cultivos primarios.....  | 35        |
| 2.1.1 Purificación de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD4+CXCR5+ y subpoblaciones de linfocitos Thf.....   | 35        |
| 2.1.2 Purificación de linfocitos B <i>Naïve</i> .....  | 36        |
| 2.2 Condiciones de cultivo.....  | 36        |
| 2.2.1 Cultivo linfocitos T CD4+ en estudio de linfocitos Th17.....   | 36        |
| 2.2.2 Cocultivo entre linfocitos T CD4+CXCR5+, CD4+CXCR5- o Thf (Thf-Th1, Thf-Th2 o Thf-Th17) y linfocitos B <i>Naïve</i> (CD19+CD27-) autólogos en estudio de linfocitos Thf..... | 37        |
| 3. CITOMETRÍA DE FLUJO .....   | 37        |
| 4. ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”).....  | 38        |
| 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....  | 38        |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>39</b> |
| A. LINFOCITOS Th17 EN LA PATOGENIA DE LA AR.....   | 41        |
| A.1 FRECUENCIA Y FENOTIPO DE LINFOCITOS Th17 .....   | 41        |

|  |    |
|--|----|
| A.1.1 Expresión de IL-17 en células T CD4+ en pacientes con AR.....  | 41 |
| A.1.2 Expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ e IL-10 en células T CD4+ en pacientes con AR.....                        | 43 |
| A.1.3 Frecuencia de células Th17/Th1 en pacientes con AR.....  | 44 |
| A.2 LINFOCITOS Th17 EN LA CLÍNICA DE LA AR.....  | 45 |
| A.2.1 Relación entre los linfocitos Th17 circulantes y parámetros clínicos en AR.....                                    | 45 |
| A.2.2 Efecto <i>in vivo</i> del tratamiento sobre la frecuencia de linfocitos Th17 y Th17/Th1<br>circulantes en AR ..... | 47 |
| B. LINFOCITOS Thf EN LA PATOGENIA DE LA AR.....  | 48 |
| B.1 CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS CD4+CXCR5+ Y LAS<br>SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Thf.....                         | 48 |
| B.2 FRECUENCIA Y FENOTIPO DE LINFOCITOS Thf Y DE LAS SUBPOBLACIONES<br>DE LINFOCITOS Thf EN AR .....                     | 49 |
| B.2.1 Aumento de la frecuencia de linfocitos Thf en sangre periférica de pacientes con AR.....                           | 49 |
| B.2.2. Equilibrio alterado de las subpoblaciones de células Thf en pacientes con AR.....                                 | 50 |
| B.2.3. Mayor frecuencia de plasmablastos circulantes en pacientes con AR con enfermedad<br>activa.....                   | 52 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | 53 |
| A. LINFOCITOS Th17 EN LA PATOGENIA DE LA AR.....   | 55 |
| B. LINFOCITOS Thf EN LA PATOGENIA DE LA AR.....  | 58 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 63 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 67 |
| <b>ANEXO</b> .....   | 91 |



## ***ABREVIATURAS***



|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>AcMc</b>                   | Anticuerpo Monoclonal   |
| <b>ACPA</b>                   | Anticuerpos antiproteínas citrulinadas ( <i>Anti-Citrullinated Protein Antibodies</i> ) |
| <b>ACR</b>                    | Colegio Americano de Reumatología   |
| <b>AR</b>                     | Artritis Reumatoide   |
| <b>ARo</b>                    | Artritis Reumatoide de reciente comienzo  |
| <b>CD40L</b>                  | CD40 Ligando  |
| <b>CGs</b>                    | Centros Germinales  |
| <b>CPAs</b>                   | Células Presentadoras de Antígeno   |
| <b>CMSPs</b>                  | Células Mononucleares de Sangre Periférica  |
| <b>CXCR</b>                   | Receptor de quemoquina ( <i>Chemokine Receptor</i> )                                    |
| <b>DAS28</b>                  | Puntuación de la actividad de la enfermedad ( <i>Disease Activity Score 28</i> )        |
| <b>D.E.</b>                   | Desviación estándar   |
| <b>ELISA</b>                  | “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”   |
| <b>FAME</b>                   | Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad                                     |
| <b>FR</b>                     | Factor Reumatoide   |
| <b>IFN<math>\gamma</math></b> | Interferón gamma  |
| <b>ICOS</b>                   | Coestimulador inducible ( <i>Inducible T-cell COStimulator</i> )                        |
| <b>Ig</b>                     | Inmunoglobulina   |
| <b>IL</b>                     | Interleuquina   |
| <b>IL-R</b>                   | Receptor de la Interleuquina  |
| <b>LES</b>                    | Lupus Eritematoso Sistémico   |
| <b>MMPs</b>                   | Metaloproteinasas de la matriz ( <i>Matrix Metalloproteinases</i> )                     |
| <b>MTX</b>                    | Metotrexato   |
| <b>PBS</b>                    | Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )                              |
| <b>PD-1</b>                   | Receptor inmunoinhibidor de muerte programada 1 ( <i>Programmed cell Death-1</i> )      |
| <b>PFA</b>                    | Paraformaldehído  |
| <b>PMA</b>                    | Acetato de forbol miristato ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )                        |
| <b>SP</b>                     | Sangre Periférica   |
| <b>TCR</b>                    | Receptor de linfocitos T ( <i>T Cell Receptor</i> )                                     |
| <b>Th</b>                     | Células T efectoras ( <i>Helper T cell</i> )  |
| <b>Thf</b>                    | Células T helper foliculares  |
| <b>Thfc</b>                   | Homólogos circulantes de células Thf  |
| <b>TGF<math>\beta</math></b>  | Factor de Crecimiento Transformante Beta ( <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )     |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> )                   |



# ***INTRODUCCIÓN***



## 1. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida asociada con una discapacidad progresiva, complicaciones sistémicas, muerte temprana y costes socioeconómicos (Firestein, 2003). Se caracteriza por la inflamación e hiperplasia de la membrana sinovial que recubre internamente la capsula articular, por la destrucción del cartílago y del hueso, por la producción de autoanticuerpos (factor reumatoide (FR) y anticuerpos antiproteínas citrulinadas (ACPA)) (Firestein et al., 2013), y por manifestaciones sistémicas, que incluyen trastornos cardiovasculares, pulmonares y esqueléticos (Hochberg et al., 2008).

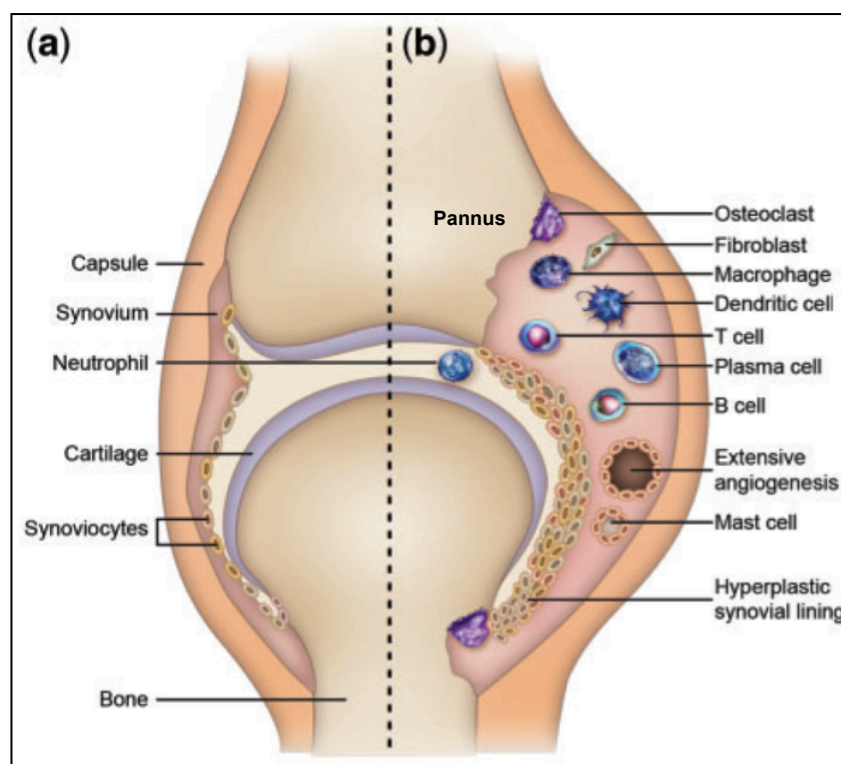
Los hallazgos basados en estudios poblacionales muestran que la prevalencia de AR se encuentra entre el 0,5% y 1% de los adultos en países desarrollados, siendo tres veces más frecuente en mujeres que en hombres. La incidencia oscila de 5 a 50 por cada 100.000 adultos y aumenta con la edad (Carbonell et al., 2008). Aunque el inicio de la enfermedad puede darse a cualquier edad, generalmente se produce entre los 30 y 50 años. La prevalencia de la AR varía geográficamente, estas variaciones son indicativo de los diferentes riesgos genéticos y ambientales que contribuyen a la incidencia y al curso de la enfermedad (Alamanos & Drosos, 2005). El tabaquismo es el factor de riesgo ambiental dominante y duplica el riesgo de desarrollar AR. Otros factores de riesgo ambientales potenciales incluyen la ingesta de alcohol, el consumo de café, los niveles de vitamina D y el uso de anticonceptivos orales (Liao et al., 2009).

El objetivo principal del tratamiento de la AR es la remisión de la enfermedad con una reducción de la inflamación y del deterioro erosivo y funcional. Las estrategias actuales de tratamiento hacen hincapié en la importancia de un diagnóstico precoz y se basan en la introducción temprana de una terapia antirreumática efectiva en el momento del diagnóstico (Vermeer et al., 2013). De los muchos fármacos antirreumáticos eficaces disponibles en la actualidad, los *fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad* (FAMEs), siguen siendo la piedra angular del tratamiento. Actualmente los FAMEs disponibles incluyen fármacos sintéticos o químicos, de los cuales la *Liga Europea Contra el Reumatismo* (EULAR) recomienda tres atendiendo a su eficacia y perfil de seguridad: metotrexato (MTX), leflunomida y sulfasalazina. Otra alternativa utilizada en el caso de que los FAMEs no sean efectivos, son las terapias biológicas, estas han revolucionado el tratamiento de la AR y otras formas de artritis y procesos autoinmunes. Se incluyen en este grupo los antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab y certolizumab), los anticuerpos monoclonales (AcMc) anti-CD20 (rituximab), anti-IL6R (tocilizumab) y la proteína de fusión compuesta por el dominio extracelular de CTLA-4, y los dominios CH2 y CH3 de la inmunoglobulina (Ig) G1 (abatacept) (Smolen et al., 2014). Por último, los glucocorticoides,

especialmente a dosis bajas, son también ampliamente utilizados para tratar la AR, su efecto sobre los signos y síntomas de la AR y sobre la reducción de la progresión del daño articular han sido demostrados (Bijlsma, 2012).

La articulación sinovial se compone de dos terminaciones óseas adyacentes recubiertas por una capa de cartílago, separadas por un espacio articular y rodeadas por la membrana sinovial y la cápsula articular. La membrana sinovial es una estructura delgada que consta de una capa íntima formada por sinoviocitos derivados de macrófagos (Tipo A) y fibroblastos (tipo B), y una subíntima en la que se encuentran fibroblastos, macrófagos y vasos sanguíneos (Smolen & Steiner, 2003) (**Figura 1**).

En la AR la capa de revestimiento se convierte en hiperplásica y la membrana sinovial se expande y forma vellosidades. La parte destructiva de la membrana sinovial se denomina *pannus*, y el elemento celular destructor es el osteoclasto. La destrucción comienza principalmente en la unión de la membrana sinovial al cartílago y al hueso. Las enzimas secretadas por neutrófilos, sinoviocitos y condrocitos conducen a la degradación del cartílago (Gravallese et al., 1998). La AR también se caracteriza inicialmente por una respuesta inflamatoria de la membrana sinovial (sinovitis) llevada a cabo por la afluencia transendotelial y/o activación local de una variedad de células mononucleares, tales como células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, así como por la formación de nuevos vasos sanguíneos (Banning, 2005). El infiltrado linfoide puede ser difuso o formar estructuras foliculares similares a folículos linfoides.



**Figura 1.** Esquema de una articulación sinovial normal (a) y una articulación afectada por AR (Modificado de Smolen & Steiner, 2003).

### 1.1 Células efectoras que participan en la patogenia de la AR



Una de las características principales de la AR es la hiperplasia sinovial, lo cual hace evidente que los fibroblastos sinoviales activados juegan un papel importante tanto en la iniciación como en la perpetuación de la AR. Es bien sabido que los fibroblastos sinoviales de AR contribuyen significativamente a la degradación de la matriz y a la destrucción ósea a través de la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), pero posiblemente también por invasión directa (Pap et al., 2003). Los fibroblastos sinoviales activados de AR producen una variedad de citoquinas y quimioquinas que median la interacción con células inflamatorias y endoteliales vecinas. En este escenario, la producción de citoquinas y quimioquinas dentro de la membrana sinovial reumatoide ayuda a reclutar células T, macrófagos y neutrófilos, que a su vez atraen a más células inflamatorias que en última instancia, favorecen el estado activado de los fibroblastos sinoviales y de los osteoclastos promoviendo la destrucción progresiva del cartílago articular y del hueso (Gravallese et al., 1998).

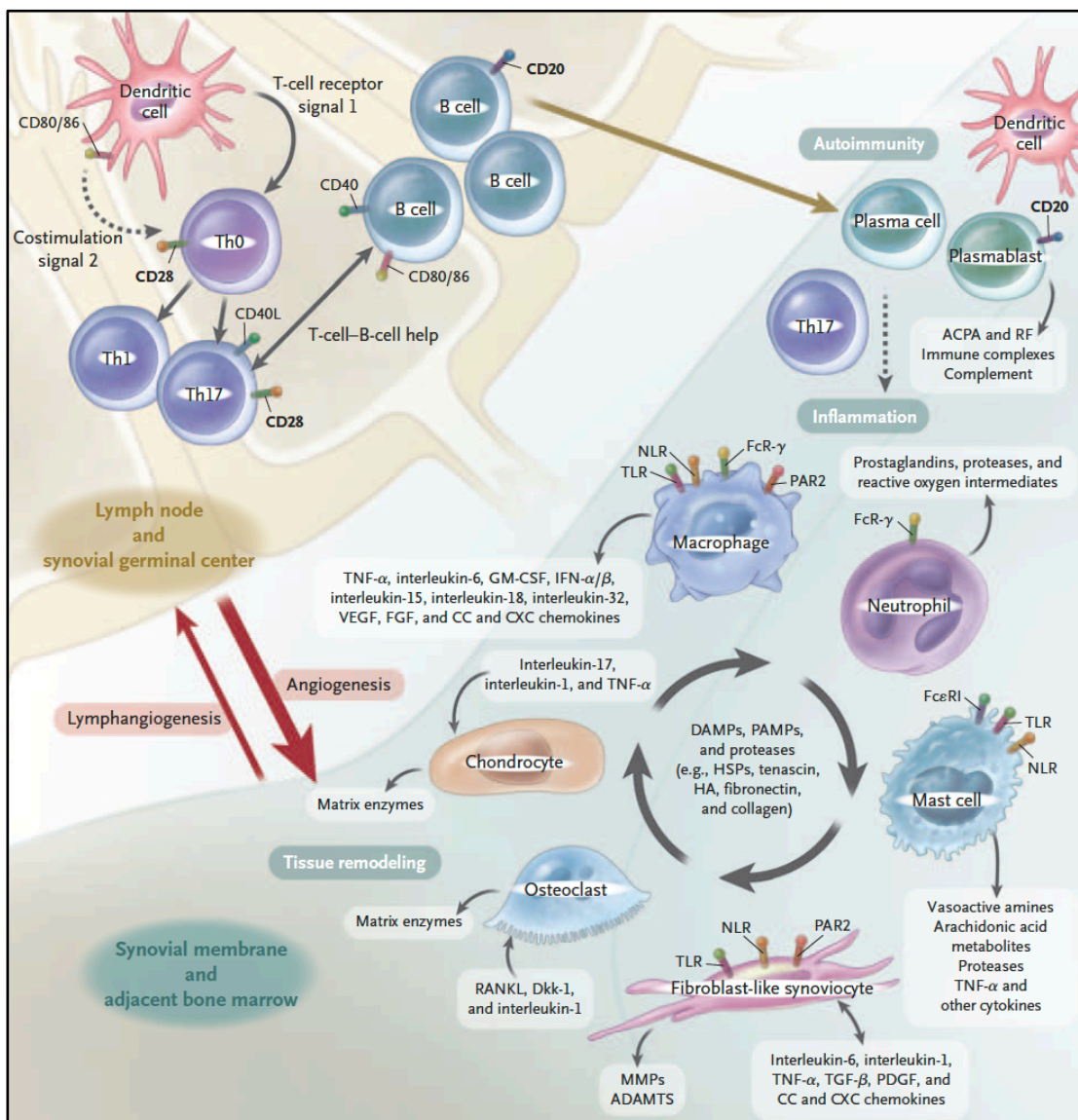
En la AR, las células T, células B, macrófagos y células dendríticas invaden la membrana sinovial, promoviendo el proceso inflamatorio y lesiones destructivas en los tejidos (**Figura 2**). Los macrófagos están críticamente involucrados en la patogenia de la AR, debido a su elevada presencia en la membrana sinovial inflamada y en la unión *pannus*-cartílago. Muestran claros signos de activación, tales como la sobreexpresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, citoquinas proinflamatorias o reguladoras (Interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$ ), quimioquinas, factores quimiotácticos y metaloproteinasas (Kinne et al., 2000). Además de su potencial capacidad presentadora de antígenos, son las células precursoras de los osteoclastos y poseen una amplia capacidad proinflamatoria, destructiva y remodeladora que contribuye considerablemente a la inflamación y destrucción articular tanto en las fases aguda, como en la fase crónica de la AR (Maeno et al., 2004).

Las células T desempeñan un papel importante en la patogenia de la AR. Estas células se infiltran en la membrana sinovial y contribuyen a la activación de macrófagos y fibroblastos (Panayi et al., 2001). La presencia de infiltrados inflamatorios, tales como estructuras foliculares en la membrana sinovial, indica la existencia de reacciones inmunes en la AR. Estas estructuras probablemente juegan un papel clave en la cooperación entre células T y células B y la generación local de autoanticuerpos FR o ACPA. El contacto célula-célula es necesario tanto en la fase inductiva de la activación de células T, como en la fase efectora, donde las células T median indirectamente la producción de autoanticuerpos, la inflamación de las articulaciones y la resorción ósea (Lundy et al., 2007).

Las células B contribuyen a la patogenia de la AR a través de la producción de anticuerpos y autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos pueden formar complejos inmunes que refuerzan la producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF, a través de la activación de la vía del complemento y del receptor Fc (Debets et al., 1988). Las células B son también

células presentadoras de antígeno (CPAs) muy eficaces que juegan un papel fundamental en la activación de células T y la perpetuación de la respuesta autoinmune. Son tanto respondedoras como productoras de quimioquinas y citoquinas que promueven la infiltración de linfocitos en la articulación, la formación de estructuras linfoides ectópicas, la angiogénesis y la hiperplasia sinovial (Panayi, 2005).

**Figura 2.** Esquema de los procesos inmunológicos en la articulación de la AR (McInnes & Schett, 2011).



## 1.2 Biomarcadores en la AR

Un biomarcador, también conocido como marcador biológico, generalmente se refiere a una medida característica que puede ser utilizada como indicador de un estado o de una condición biológica. Es un parámetro que puede ser químico, físico o biológico. Los biomarcadores juegan un papel fundamental en el diagnóstico de enfermedades y en la

intervención en etapas tempranas. También son útiles para conocer el efecto del tratamiento y cómo el organismo está actuando o respondiendo a la medicación. Por lo tanto, el estudio y la medición de marcadores biológicos en sangre o en otro tipo de fluido corporal, puede servir no sólo como indicador de diagnóstico, sino también como indicador de pronóstico y de respuesta al tratamiento (Niu & Chen, 2014). En este apartado, hablaremos de algunos de los biomarcadores implicados en la clínica, la patogenia y la progresión de la AR.

### **1.2.1 Citoquinas**

Las citoquinas comprenden un amplio grupo de proteínas secretadas por numerosos tipos celulares que median la comunicación entre células. Están implicadas en la respuesta inmunológica con un efecto proinflamatorio o antiinflamatorio, modulando la actividad funcional de células individuales y de tejidos, con un efecto autocrino y paracrino (Burska et al., 2014).

Están implicadas en la respuesta proinflamatoria en la AR e incluyen la IL-1, IL-6, IL-17 y TNF $\alpha$  entre otras (**Tabla 1**). La IL-1 secretada por macrófagos, monocitos, células B y células T activadas, estimula la liberación de MMPs, causando la destrucción del cartílago. La IL-6, producida por células T, células B, fibroblastos, monocitos y macrófagos, promueve la diferenciación y maduración de células B, provocando un incremento de la producción de autoanticuerpos. Además, la IL-6 aumenta la resorción ósea, induce la respuesta de fase aguda (proteína C-reactiva (PCR)), y estimula la proliferación de fibroblastos sinoviales que causan la destrucción del tejido óseo y el cartílago mediante la liberación de MMPs (Choy & Panayi, 2001). Aunque las células B, células T y fibroblastos producen TNF $\alpha$ , los productores primarios son monocitos y macrófagos. El TNF induce la síntesis de varias citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, que a su vez pueden activar macrófagos lo que conduce a la producción continua de citoquinas, la proliferación de fibroblastos, un aumento de expresión de moléculas de adhesión, el reclutamiento de otras células inflamatorias y la inducción de la angiogénesis. El TNF también estimula la síntesis de MMPs que median en la destrucción del hueso y el cartílago (Ackermann & Kavanaugh, 2007). Por otro lado, la IL-17 está emergiendo como una importante citoquina relacionada con la inflamación y la destrucción de las articulaciones. Esta citoquina es producida por un subconjunto de células T CD4<sup>+</sup>, las Th17, y ha sido recientemente implicada en la patogenia de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, incluyendo la AR (Shahrara et al., 2008).

Sin embargo, si las citoquinas proinflamatorias son abundantes en todos los pacientes con AR, las citoquinas clásicamente definidas como antiinflamatorias y reguladoras (IL-4, IL-10 e IL-13), están también presentes en esta patología (Chabaud et al., 1998). Estas citoquinas, también definidas como citoquinas Th2, han sido clasificadas como antiinflamatorias debido a

su efecto inhibitor sobre la producción de IL-1, IL-8, IL-6, y TNF $\alpha$  por monocitos y otros tipos celulares sinoviales (van Roon et al., 1996) (Sugiyama et al., 1995). Una característica importante de la sinovitis reumatoide es la deficiencia en la expresión relativa de varias citoquinas reguladoras, lo que contribuye al desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en las articulaciones (Feldmann et al., 1996).

| Cytokine                          | Articular cell expression  | Potential functions in the pathogenesis of rheumatoid arthritis  |
|-----------------------------------|--|--|
| IL-1 $\alpha$ and/or IL-1 $\beta$ | Monocytes, B cells, synovial fibroblasts, chondrocytes                                     | $\uparrow$ Synovial fibroblast cytokine, chemokine, MMP, iNOS and PG release; $\uparrow$ monocyte cytokine, ROI and PG release; osteoclast activation; $\downarrow$ GAG synthesis, $\uparrow$ iNOS, MMP and aggrecanase; endothelial-cell adhesion molecule expression   |
| IL-18                             | Monocytes, PMNs, DCs, platelets, endothelial cells   | T-cell differentiation ( $T_H1$ cells with IL-12; $T_H2$ cells with IL-4); NK-cell activation, cytokine release and cytotoxicity; $\downarrow$ chondrocyte GAG synthesis, iNOS expression; monocyte cytokine release and adhesion molecule expression; PMN activation, cytokine release and migration; pro-angiogenic for endothelial cells  |
| TNF                               | Monocytes, T cells, B cells, NK cells, PMNs, mast cells, synovial fibroblasts, osteoblasts | $\uparrow$ Monocyte activation, cytokine and PG release; $\uparrow$ PMN priming, apoptosis and oxidative burst; T-cell apoptosis, clonal regulation and TCR dysfunction; $\uparrow$ endothelial-cell adhesion molecule expression, cytokine release; $\downarrow$ synovial fibroblast proliferation and collagen synthesis, $\uparrow$ MMP and cytokine release; $\uparrow$ adipocyte FFA release; endocrine effects |
| LT $\alpha$ and/or LT $\beta$     | T cells, monocytes, synovial fibroblasts   | Peripheral lymphoid organ development; otherwise similar bioactivities to TNF  |
| RANKL                             | Stromal cells, osteoblasts, T cells  | Stimulates bone resorption via osteoclast maturation and activation; modulates T-cell-DC interactions  |
| BAFF                              | Monocytes, T cells, DCs  | B-cell proliferation, antibody secretion, isotype switching and survival; T-cell co-stimulation  |
| APRIL                             | Monocytes, T cells   | B-cell proliferation   |
| IL-17A                            | $T_H17$ cells, synovial fibroblasts  | $\uparrow$ Synovial fibroblast cytokine and MMP release; osteoclastogenesis; haematopoiesis; $\downarrow$ chondrocyte GAG synthesis; $\uparrow$ leukocyte cytokine production  |
| IL-12                             | Macrophages, DCs   | $T_H1$ -cell proliferation and maturation; T-cell and NK-cell cytotoxicity; B-cell activation  |
| IL-23                             | Macrophages, DCs   | $T_H17$ -cell proliferation  |
| IL-7                              | Synovial fibroblasts, monocytes?   | T-cell expansion and survival; macrophage activation; haematopoietic regulation; thymic regulation; NK-cell maturation   |
| IL-15                             | Monocytes, synovial fibroblasts, mast cells, B cells, PMNs, DCs                            | T-cell chemokinesis, activation and memory maintenance; B-cell differentiation and isotype switching; NK-cell activation and cytotoxicity; synovial fibroblast activation; macrophage activation/suppression (dose dependent); PMN activation, adhesion molecule expression and oxidative burst  |
| IL-10                             | Monocytes, T cells, B cells DCs, epithelial cells  | $\uparrow$ Macrophage cytokine release, iNOS and soluble receptor expression, $\downarrow$ ROI; T-cell cytokine release, $\downarrow$ MHC expression, anergy induction, $T_H1$ -cell maturation and effector function(?); $\downarrow$ DC activation and cytokine release; $\downarrow$ synovial fibroblast MMP and collagen release; $\uparrow$ B-cell isotype switching  |
| IL-6                              | Monocytes, synovial fibroblasts, B cells, T cells  | B-cell proliferation and antibody production; haematopoiesis and thrombopoiesis; T-cell proliferation, differentiation and cytotoxicity; $\uparrow$ hepatic acute-phase response; $\uparrow$ neuroendocrine effects  |
| Oncostatin M                      | Monocytes, activated T cells   | Megakaryocyte differentiation; $\uparrow$ synovial fibroblast TIMP and cytokine release, $\uparrow$ acute-phase reactants, $\uparrow$ protease inhibitors; $\downarrow$ monocyte TNF release, $\downarrow$ IL-1 effector function; $\uparrow$ neuroendocrine effects and corticosteroid release; osteoblast modulation(?)  |
| TGF $\beta$                       | Synovial fibroblasts, monocytes, T cells, platelets  | Wound repair, matrix maintenance and fibrosis; $T_H17$ - and $T_{reg}$ -cell proliferation; $\downarrow$ NK-cell proliferation and effector function; initial activation then suppression of inflammatory responses; $\uparrow$ early phase leukocyte chemoattractant, gelatinase and integrin expression; early macrophage activation then suppression; $\downarrow$ iNOS expression                                |
| BMP family (BMP2–BMP15)           | Epithelial cells, synovial fibroblasts, mesenchymal embryonic tissues                      | Regulate crucial chemotaxis, mitosis and differentiation processes during chondrogenesis and osteogenesis; tissue morphogenesis  |
| PDGF                              | Platelets, macrophages, endothelial cells, synovial fibroblasts                            | Paracrine and/or autocrine growth factor for various lineages; wound healing   |
| FGF family                        | Synovial fibroblasts, monocytes  | Growth and differentiation of mesenchymal, epithelial and neuroectodermal cells  |
| VEGF                              | Monocytes, endothelial cells, synovial fibroblasts   | Angiogenesis   |
| IL-32                             | Epithelial cells, monocytes(?), synovial fibroblasts(?)                                    | Macrophage cytokine, PG and MMP release  |

**Tabla 1.** Citoquinas implicadas en la patogenia de la AR (McInnes & Schett, 2007).

### 1.2.2 Autoanticuerpos

La AR está típicamente asociada con la autoinmunidad sistémica con evidencias serológicas como la presencia de autoanticuerpos en suero y líquido sinovial. El primer autoanticuerpo hallado en la AR fue el FR, descrito por *Waalder* en 1940 (Waalder, 2007). En 1993 se identificó la filagrina como el antígeno diana de los anticuerpos antiqueratina

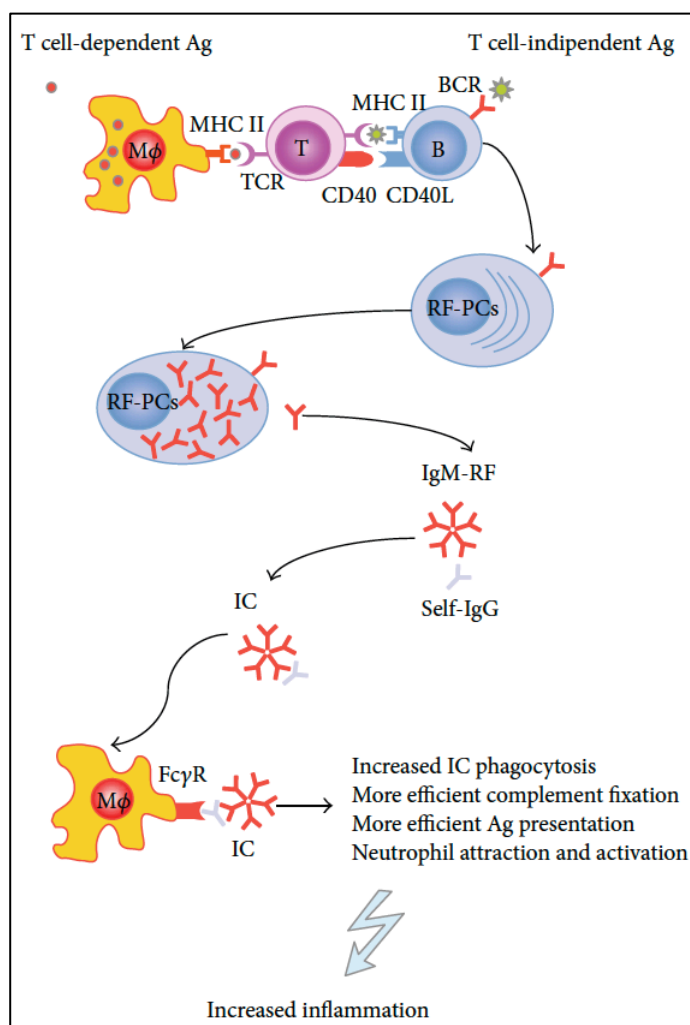
específicos de la AR (AKAs) (Simon et al., 1993), pero posteriormente se demostró que los AKAs y otros autoanticuerpos específicos de AR conocidos como factores antiperinuclear (APFs) y anticuerpos anti-SA, reconocían péptidos que contenían citrulina como una estructura antigénica común y pasaron a denominarse colectivamente ACPA (Schellekens et al., 1998).

- **Factor Reumatoide**

El FR corresponde a una familia de autoanticuerpos dirigidos contra la región Fc de la IgG. En la AR son producidos no sólo sistemáticamente, sino también localmente por las células B presentes en los folículos de los órganos linfoides y en las estructuras similares a los centros germinales (CGs) que se desarrollan en la membrana sinovial inflamada (Wernick et al., 1985). Las pruebas de FR en pacientes con AR tienen una sensibilidad del 60% al 90% y una especificidad del 85%, por lo que está incluido en los criterios de clasificación para la AR del *Colegio Americano de Reumatología* (ACR) y de EULAR (Arnett et al., 1988) (Aletaha et al., 2010). El FR IgM es el isotipo medido con mayor frecuencia, pero el FR IgG e IgA también se pueden detectar (Nishimura et al., 2007). Numerosas hipótesis se han postulado para explicar el posible papel del FR en la AR, incluyendo su capacidad para aumentar la eliminación de complejos inmunes por los macrófagos (Zvaifler, 1973). También se ha sugerido que el FR potencia la presentación de antígenos a las células T por medio de células dendríticas que captan complejos inmunes con antígenos exógenos y por medio de células B FR, que parecen ser CPAs más eficientes que otras células B (Stewart et al., 1997). Por otra parte, varios estudios han demostrado que los complejos inmunes aislado de pacientes con AR inducen en células mononucleares de sangre periférica la producción de  $\text{TNF}\alpha$  u otras citoquinas a través del receptor Fc (RFc $\gamma$ IIa) (Mathsson et al., 2006) (**Figura 3**).

Se ha detectado FR en muchas otras enfermedades autoinmunes, así como en condiciones no autoinmunes (Shmerling & Delbanco, 1991). Aunque el FR es normalmente inducido durante la respuesta inmune secundaria, el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad se limita a los pacientes con AR y no se observa en individuos normales. Por lo tanto, la aparición del FR de alta afinidad, que se cree que depende de la ayuda de células T, está bajo control estricto en sujetos normales, mientras que en la AR estos mecanismos de control parecen ser ignorados (Song & Kang, 2010). Los pacientes de AR con una prueba de suero FR persistentemente positiva, generalmente tienen más anomalías radiológicas, más actividad de la enfermedad, peor capacidad funcional, más nódulos reumatoides y otras manifestaciones extra-articulares, y tienen la necesidad de más tratamientos con segunda línea de medicamentos que los pacientes con una prueba FR persistentemente negativa (van Zeben et al., 1992). Los cambios en los niveles séricos de FR pueden utilizarse como indicadores de actividad de la

enfermedad y por eso también han demostrado ser útiles en la respuesta de control al tratamiento.

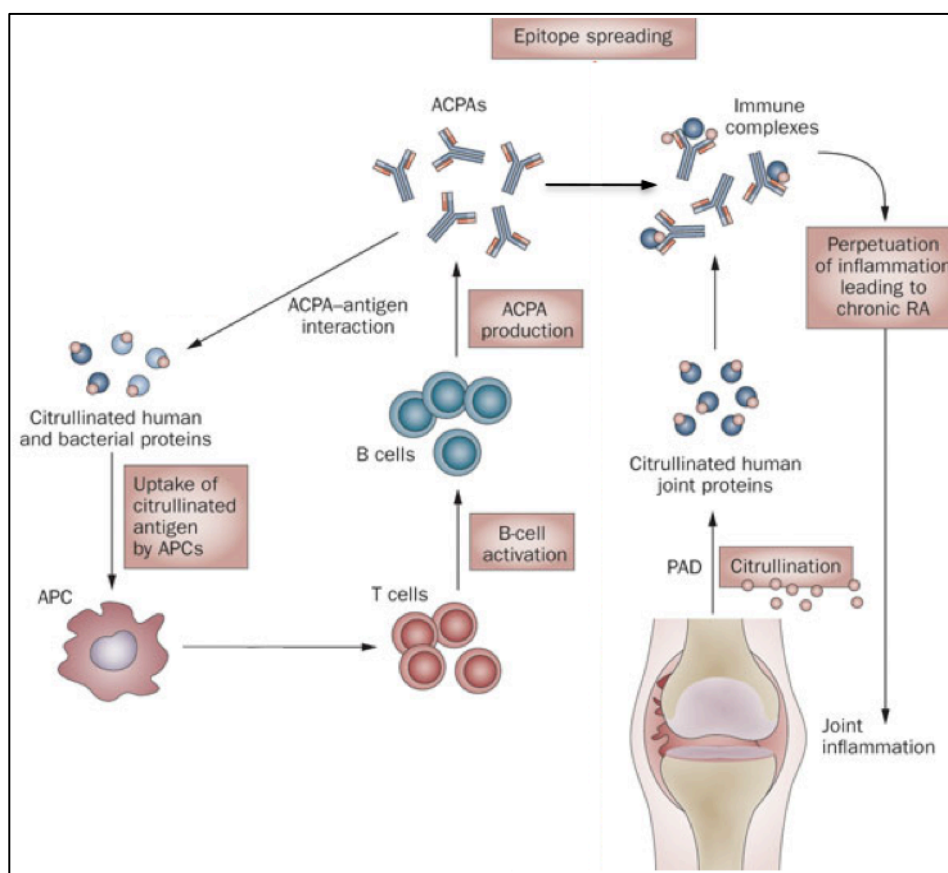


**Figura 3.** Papel inmunológico del FR en AR. Ag: Antígeno; BCR: Receptor de célula B; TCR: Receptor de célula T; RF-PCs: Células plasmáticas factor reumatoide; IC: Complejos inmunes. (Ingegnoli et al., 2013)

- **ACPA**

Los llamados ACPA han sido objeto de un creciente interés científico y clínico. Se encuentran aproximadamente en el 80% de los pacientes con AR y tienen una alta especificidad para el diagnóstico de la enfermedad (98%). En consecuencia, rara vez se encuentran en otras enfermedades o en individuos sanos (Schellekens et al., 2000). Los ACPA se producen tanto a nivel sistémico, como a nivel local en las articulaciones de pacientes con AR, donde las proteínas son citrulinadas durante el proceso inflamatorio (Reparon-Schuijt et al., 2001). La citrulina es un aminoácido no estándar generado por la modificación postraduccional de la arginina a través de la enzima peptidil arginina deaminasa (PAD) durante una variedad de procesos biológicos (Vossenaar et al., 2003) (**Figura 4**). Se han encontrado péptidos

citrulinados en tejidos sinoviales de pacientes con AR, así como en controles que no tenían AR, pero la formación de anticuerpos contra las proteínas citrulinadas parece ser muy específica de AR (Vossenaar et al., 2004).



**Figura 4.** Resumen del papel patogénico de los ACPA en la AR (Modificado de Lundberg et al., 2010).

En el líquido sinovial así como en el tejido sinovial de pacientes con AR, se han detectado complejos inmunes formados por ACPA y proteínas citrulinadas (Van Steendam et al., 2010). Como muchas de las funciones efectoras de la IgG son mediadas por su unión a los receptores Fc de baja afinidad (FcγRIIA y FcγRIIIA) de la superficie de diversas células, la idea de que los complejos inmunes sean *un disparador* inicial de la sinovitis y la pérdida ósea en la AR está ampliamente aceptada (Nimmerjahn & Ravetch, 2010). En las articulaciones inflamadas de los pacientes con AR, el tejido sinovial está fuertemente infiltrado por células inmunes que pueden unirse a los complejos inmunes y responder. La mayor parte de la investigación se ha llevado a cabo en los macrófagos, los cuales ha sido descrito que producen altas cantidades de TNFα tras su estimulación con complejos inmunes derivados de fibrinógeno citrulinado y con ACPA de sueros humanos (Clavel et al., 2008). Independientemente de la formación de complejos inmunes, los macrófagos pueden ser activados por la unión directa del ACPA monomérico a proteínas citrulinadas de su propia superficie celular (Lu et al., 2010). Por



otro lado, recientemente se ha demostrado que los osteoclastos, así como sus precursores, expresan vimentina citrulinada en su superficie celular la cuál podría ser objetivo de los ACPA (Harre et al., 2012). La unión de los ACPA a preosteoclastos conduce a un aumento de la osteoclastogénesis debido a la producción de TNF $\alpha$  y por consiguiente a una mayor resorción ósea *in vitro* e *in vivo*. Aunque los mecanismos exactos por los que los ACPA interactúan con los precursores de osteoclastos todavía no están claros, estos resultados proporcionan la primera evidencia de una diferenciación de osteoclastos mediada por autoanticuerpos (Kleyer et al., 2014). La formación de complejos inmunes entre ACPA y proteínas citrulinadas y la posterior fijación del complemento ha sido recientemente descrita en la sinovial de la AR, este hecho perpetúa la inflamación y provoca un círculo vicioso que podría ser en parte responsable de la cronicidad de la enfermedad (Trouw et al., 2009).

Los ACPA pueden ser detectados en los pacientes antes de la aparición de síntomas clínicos, con un aumento de los títulos según se aproximan al inicio de la enfermedad (Chibnik et al., 2009). Además, estudios preliminares han evidenciado que la presencia de ACPA también tiene un significado pronóstico, ya que se demostró que pacientes ACPA positivos desarrollaban daño radiológico significativamente más grave que pacientes ACPA negativos (Syversen et al., 2008). Por otra parte, las manifestaciones extraarticulares que a menudo determinan la gravedad y comorbilidad de la AR, también están estrechamente asociados con la positividad para ACPA (Aubart et al., 2011). Por lo tanto, dada la relevancia clínica de los ACPA, no es de extrañar que en los nuevos criterios de clasificación de la AR del ACR/EULAR 2010, se hayan incluido los títulos de ACPA con el fin de mejorar el diagnóstico de la AR temprana (Aletaha et al., 2010).

## **2. LINFOCITOS T CD4+**

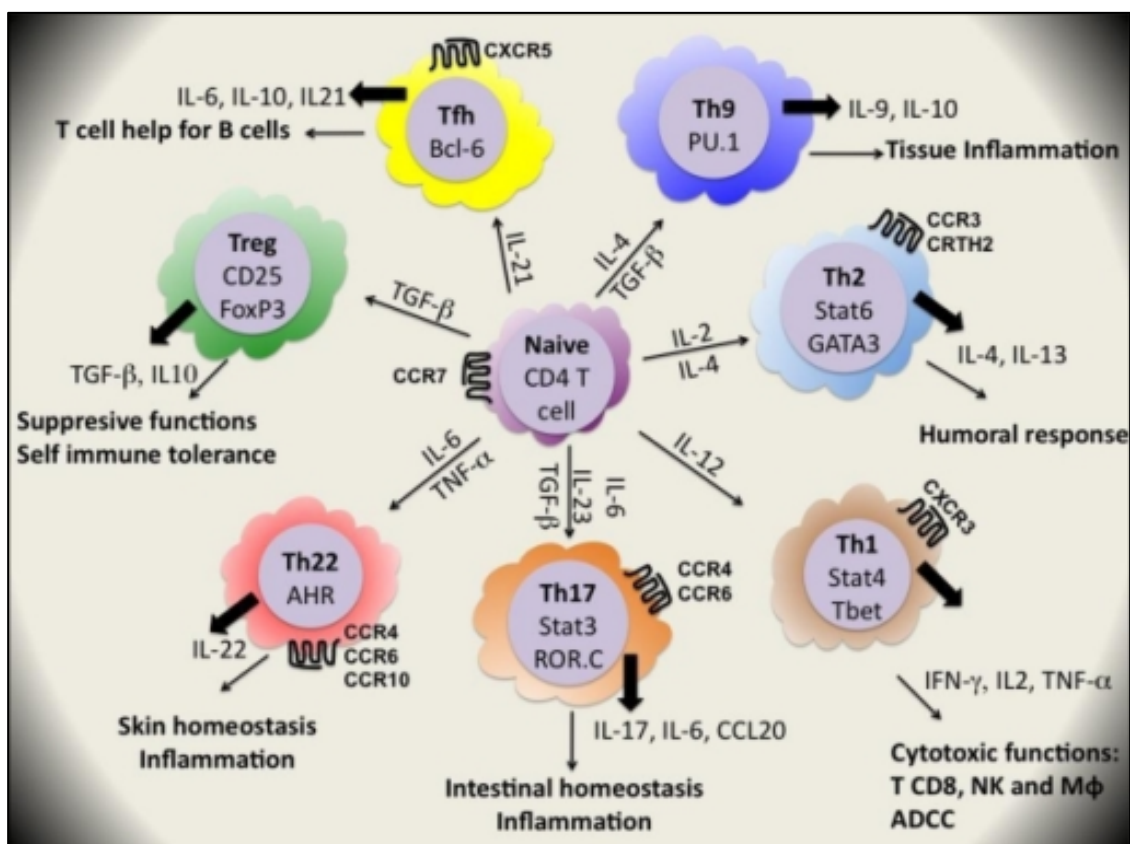
Las células T que expresan CD4+ tienen un papel importante en la respuesta inmune adaptativa. El paso inicial para la diferenciación de las células T *naïve* es la estimulación antigénica que resulta de la interacción del receptor de células T (TCR) y el CD4 como co-receptor, con el complejo antígeno-MHC II presentado por CPAs. La activación del TCR junto con CD3 induce una cascada de vías de señalización que conduce a la proliferación de las células T y a su diferenciación en células efectoras específicas. Las células T por lo general necesitan al menos una segunda señal para su completa activación (Müller et al., 1989). Estas señales secundarias se producen a través de la coestimulación, en forma de ligandos expresados en la superficie de CPAs y de citoquinas solubles de CPAs. Las señales coestimuladoras aumentan la señal TCR, promoviendo la proliferación y la diferenciación. El principal receptor coestimulador es el CD28, que se expresa en todas las células T *naïve* y cuyos ligandos en las CPAs son el CD80 y CD86, que se expresan en la membrana de las CPAs tras su activación.



Existen otras moléculas coestimuladoras menos potentes como el coestimulador inducible (ICOS) homólogo de CD28 (Frauwirth & Thompson, 2002). La interacción del CD80 y CD86 con el CD28 en combinación con el reconocimiento del antígeno por el TCR induce la producción de IL-2, el principal factor de crecimiento de células T, así como un aumento de la expresión de su receptor (IL-2R). La activación de células T *naïve* a través del TCR en ausencia de coestimulación conduce a la anergia o muerte celular.

La diferenciación a un subtipo específico de células T, depende de las citoquinas del entorno, así como de la concentración de antígenos, del tipo de CPA con el que interactúe y de las moléculas coestimuladoras (Tao et al., 1997). La fuente inicial de citoquinas proviene de las CPAs, así como de varios miembros de células inmunes innatas. Posteriormente, algunas de las citoquinas producidas por las células T diferenciadas pueden crear un bucle de retroalimentación positiva favoreciendo la diferenciación y la respuesta de estas células T.

Las células T CD4<sup>+</sup> humanas se pueden subdividir en diferentes subtipos en base a sus funciones inmunológicas, que son apoyadas por la expresión de perfiles específicos de factores de transcripción, citoquinas y receptores de membrana (**Figura 5**). Estos subtipos incluyen células T efectoras (Th), que protegen de los agentes patógenos y células T reguladoras, que controlan la intensidad y duración de la respuesta inmune frente a patógenos y al mismo tiempo protegen frente a la aparición de respuestas autoinmunes (Cosmi et al., 2014).



**Figura 5.** Esquema de los diferentes subtipos de células T CD4<sup>+</sup> (Février e al., 2011).

La primera aproximación para definir los distintos subconjuntos de células Th fue el

trabajo pionero de *Mosmann y Coffman* (Mosmann & Coffman, 1989), quienes observaron que las células Th podían distinguirse según el conjunto de citoquinas secretadas. Describieron dos subconjuntos distintos, las células Th1 y las células Th2, que diferían en que las células Th1 producían interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y actuaban frente a patógenos intracelulares y las células Th2 que producían IL-4 y estaban involucradas en la protección frente a parásitos extracelulares. Este paradigma dicotómico de los subconjuntos Th1 y Th2 persistió durante más de 20 años, hasta que hace unos años la aparición de las células Th17 acabase con este dualismo de sólo dos subconjuntos de células Th (Harrington et al., 2005). Tras el descubrimiento de las células Th17, que deben su nombre a la secreción de la citoquina IL-17 y cuyo papel es crucial en la defensa contra patógenos extracelulares, otros subconjuntos de células Th han sido descritos, incluyendo las células Th22 que expresan IL-22 y juegan un papel crucial en la defensa contra bacterias Gram-negativas (Honda, 2012), las Th9 que expresan IL-9 y están involucradas en enfermedades que van desde la autoinmunidad al asma (Jabeen & Kaplan, 2012) y los linfocitos Th foliculares (Thf), que se localizan en los CGs de los folículos de los órganos linfoides, donde median su función ayudadora de linfocitos B (King et al., 2008). Este sistema de clasificación está ampliamente aceptado y los libros de texto de inmunología utilizan estos términos para distinguir los diferentes subconjuntos de células Th. Sin embargo, la realidad es un poco más compleja, ya que algunas células T pueden cambiar su perfil de producción de citoquinas cuando se exponen a ciertos microambientes. Esta observación se ha atribuido a la plasticidad de los subconjuntos de células Th. La diferenciación de células T fue inicialmente considerada lineal e irreversible, pero hallazgos recientes indican que este proceso es flexible y que las llamadas células comprometidas pueden adquirir características de diferentes células efectoras bajo los estímulos adecuados (O'Shea & Paul, 2010). Los linfocitos Th17 representan un ejemplo paradigmático de la producción flexible de citoquinas, ya que se ha demostrado que pueden diferenciarse a Th1 en presencia de IL-12 o TNF $\alpha$  (Maggi et al., 2014), y a Th2 en presencia de IL4 (Cosmi et al., 2010). Este hecho es especialmente importante ya que estas células T *híbridas* cambian de función tras la adquisición de propiedades adicionales de secreción de citoquinas, tanto los linfocitos Th17/Th1 como los linfocitos Th17/Th2 parecen tener un fenotipo más agresivo y patogénico que los fenotipos Th17, Th1 o Th2 convencionales (Cosmi et al., 2011a)(Cosmi et al., 2011b).

## 2.1 Linfocitos Th17

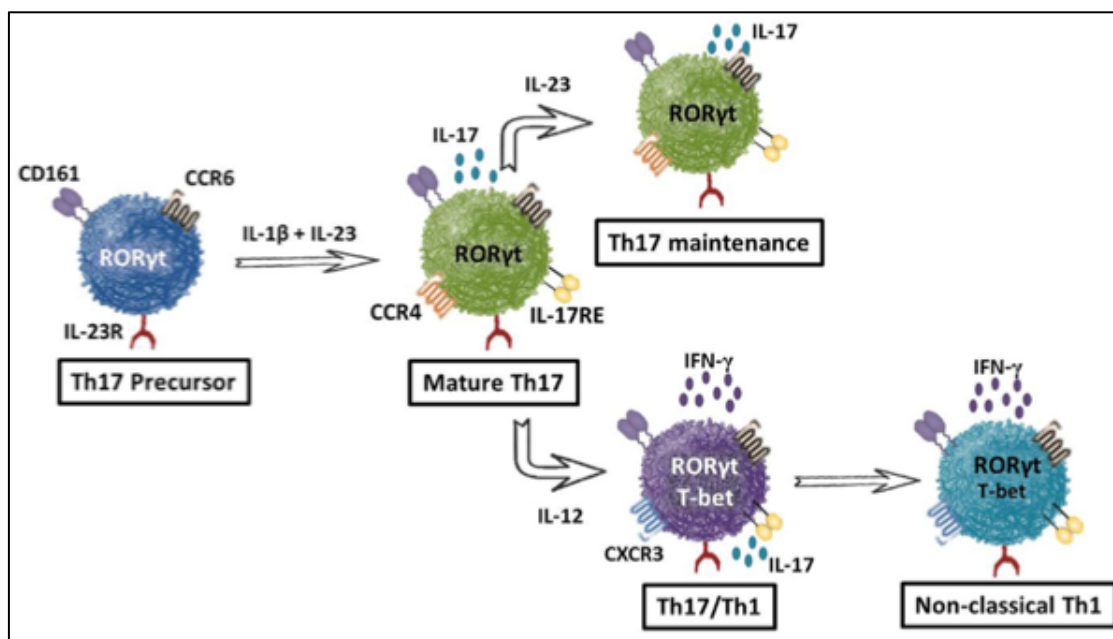
Los linfocitos Th1 eran considerados las principales células T efectoras implicadas en patologías inflamatorias asociadas a enfermedades autoinmunes, como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), el síndrome de Sjögren, la AR y la psoriasis (Axtell et al., 2013), pero tras su descubrimiento, las células Th17 han sido consideradas las verdaderas células patogénicas implicadas en muchos trastornos inflamatorios crónicos, dejando el papel patogénico de las Th1

infravalorado o incluso atribuyéndoles un papel protector (Chen & O'Shea, 2008). Más recientemente, el concepto de que ambas células, Th17 y Th1, puedan desempeñar un papel en la patogenia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias ha sido sugerido y apoyado por el hallazgo de que estos dos subconjuntos de células pueden desarrollarse a partir de un mismo precursor y coexistir en un mismo microambiente (Nistala et al., 2010).

Originalmente denominada antígeno de linfocitos T citotóxico 8 (CTLA8), la IL-17 fue identificada por primera vez en 1993 a partir de un clon de células T murinas activadas (Rouvier et al., 1993) y posteriormente clonada a partir de una librería de células T CD4+ humanas. Se trata de una glicoproteína de 155 aminoácidos con un 63% de homología con el CTLA8 murino (Yao et al., 1995). La IL-17A, a la cual nos referiremos como IL-17, es ahora reconocida como miembro de una única familia de citoquinas que incluye otros cinco miembros (de IL-17B a IL-17F) y 5 receptores (de IL-17RA a IL-17RE). La IL-17 e IL-17F son los principales miembros de esta familia y ambas se unen y actúan a través del receptor formado por una subunidad IL-17RA y una subunidad IL-17RC. La IL-17 es aproximadamente de 10 a 30 veces más potente que la IL-17F y aunque ambas se unen al mismo receptor, regulan la expresión génica mediante vías de señalización similares pero no idénticas (Gaffen, 2009). En sinoviocitos tipo fibroblasto reumatoide, la IL-17 e IL-17F inducen la expresión de 165 y 27 genes relacionados con la inflamación, respectivamente (Hot et al., 2011). De los otros miembros de la familia de la IL17, la IL-17E (también conocido como IL-25) parece estar implicada en la estimulación de respuestas Th2, mientras que la IL-17B, IL-17C e IL-17D están escasamente caracterizadas (Gaffen, 2009).

En los últimos años, varias características fenotípicas y funcionales de los linfocitos Th17 humanos han sido descritas, permitiendo de esta manera una mejor identificación *ex vivo* e *in vitro* de este subconjunto celular. Las células Th17 expresan el factor de transcripción RORC, el receptor de IL-23, los receptores de quimioquinas CCR6 y CCR4 y el receptor de lectina CD161 (Acosta-Rodriguez et al., 2007)(Cosmi et al., 2008). El origen de los linfocitos Th17 ha sido objeto de un intenso debate en los últimos años. Inicialmente se describió que la presencia simultánea de IL-1 $\beta$  e IL-23 era requerida para inducir la diferenciación de los linfocitos Th17 a partir de un pequeño subconjunto de células T precursoras CD4+CD161+, detectables tanto en sangre de cordón umbilical humano como en el timo (Cosmi et al., 2008). El papel desempeñado por el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) en el desarrollo de los linfocitos Th17 humanos es algo controvertido, se ha descrito recientemente que este no tiene un efecto directo, sino que puede desempeñar un papel permisivo indirecto mediante la supresión de la diferenciación de células Th1 y Th2. El TGF- $\beta$  es capaz de aumentar las proporciones relativas de células T CD4+CD161+ que se diferencian hacia células Th17 en respuesta a IL-1 $\beta$  e IL-23, y al mismo tiempo inhibir la expresión de T-bet y GATA-3 y consecuentemente el desarrollo de linfocitos Th1 y Th2 (Santarlaschi et al., 2009).

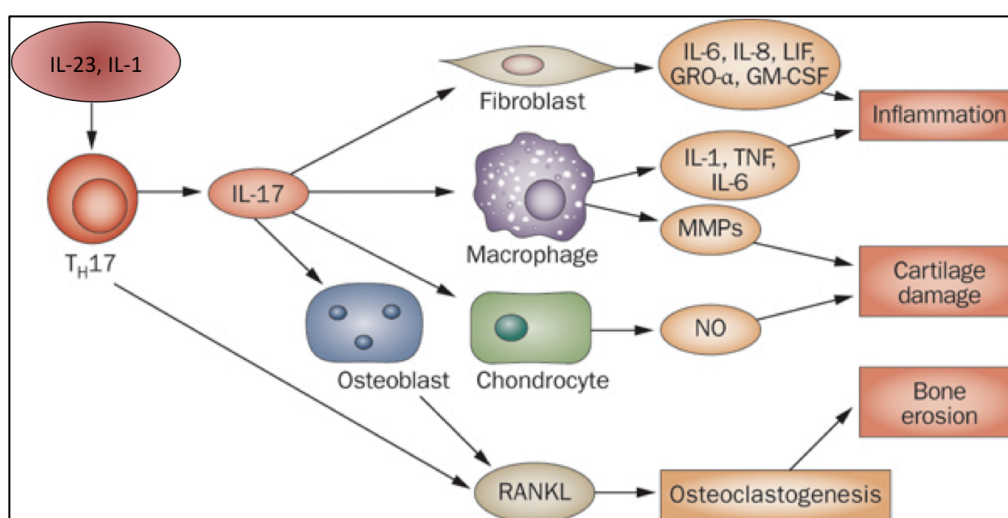
La observación de que células Th17 polarizadas puedan transformarse *in vitro* e *in vivo* en células Th17/Th1 y posteriormente en Th1 indica un grado de plasticidad en este subconjunto de células T y apoya la hipótesis de un ancestro común entre las células Th17 y Th1 ya que ambas expresan CD161 (Nistala et al., 2010). La expresión de genes Th17 (RORC, CCR6 e IL-23) en células Th1 sinoviales de articulaciones inflamadas, y la superposición de secuencias TCR entre linfocitos Th17 y Th1 sugiere que la conversión de Th17 a Th1 es un fenómeno real. Las células Th1 derivadas de Th17, llamadas Th1 no clásicas, se pueden distinguir fácilmente de las Th1 clásicas a partir de la expresión de CD161, RORC, IL-17RE y CCR6, ya que la expresión de estos mismos marcadores está prácticamente ausente en las células Th1 clásicas (Maggi et al., 2012) (**Figura 6**). La presencia en el microambiente inflamatorio de IL-12 y más recientemente demostrado, la presencia de  $\text{TNF}\alpha$ , puede conducir al desplazamiento de los linfocitos Th17 hacia el fenotipo Th1 no clásico (Lorenzo Cosmi et al., 2011)(Maggi et al., 2014). Finalmente, *Cosmi et al.* (Cosmi et al., 2010) describieron la existencia de linfocitos Th17/Th2 humanos originados a partir de células T de memoria  $\text{CD4}+\text{CD161}+\text{CCR6}+$  expuestas a IL-4, que producían IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 además de IL-17, IL-8 e IL-22. Estas células Th17/Th2 también eran capaces de inducir la producción de IgE, confirmando así que exhibían propiedades funcionales tanto de linfocitos Th17 como de Th2.



**Figura 6.** Plasticidad de los linfocitos Th17 (Modificado de Murdaca et al., 2011).

La IL-17 puede actuar directamente sobre los macrófagos y fibroblastos sinoviales, originando un aumento de producción de citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en la sinovial de la AR (Jovanovic et al., 1998)(Katz et al., 2001) (**Figura 7**). Asimismo, la IL-17 contribuye al reclutamientos de células inflamatorias incluyendo neutrófilos, células dendríticas, células Th17 y macrófagos, en las articulaciones con AR (Shahrara et al., 2009). En

sinergia con el TNF $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , que son los mediadores proinflamatorios centrales principalmente derivados de macrófagos sinoviales activados, la IL-17 ha demostrado ser un potente estimulador de la producción de MMPs en condrocitos y fibroblastos sinoviales, favoreciendo la degradación del cartílago (Van Bezooijen et al., 2002)(Koenders et al., 2006). La IL-17 derivada de células Th17 ha demostrado ser un fuerte promotor de la osteoclastogénesis principalmente a través de la inducción, en fibroblastos y osteoblastos sinoviales, del receptor activador del NF-kB ligando (RANKL), el estimulador fundamental para la maduración y la activación de los osteoclastos, aumentando enormemente las erosiones óseas marginales de las articulaciones periféricas en pacientes con AR activa (Adamopoulos et al., 2010). Hasta la fecha las células Th17 han demostrado ser el único subconjunto de células T helper osteoclastogénico (Sato et al., 2006). Por otro lado, las células Th17 pueden expresar el quimiotáctico CXCL13, que es un fuerte atrayente de células B, favoreciendo así el reclutamiento de células B autorreactivas hacia la sinovial de AR (Takagi et al., 2008). Asimismo, tanto la IL-17 como la IL-21 pueden representar un papel crucial dirigiendo la respuesta de los CGs ectópicos sinoviales en la AR, posiblemente aumentando la producción local de autoanticuerpos patógenos (Mitsdoerffer et al., 2010).

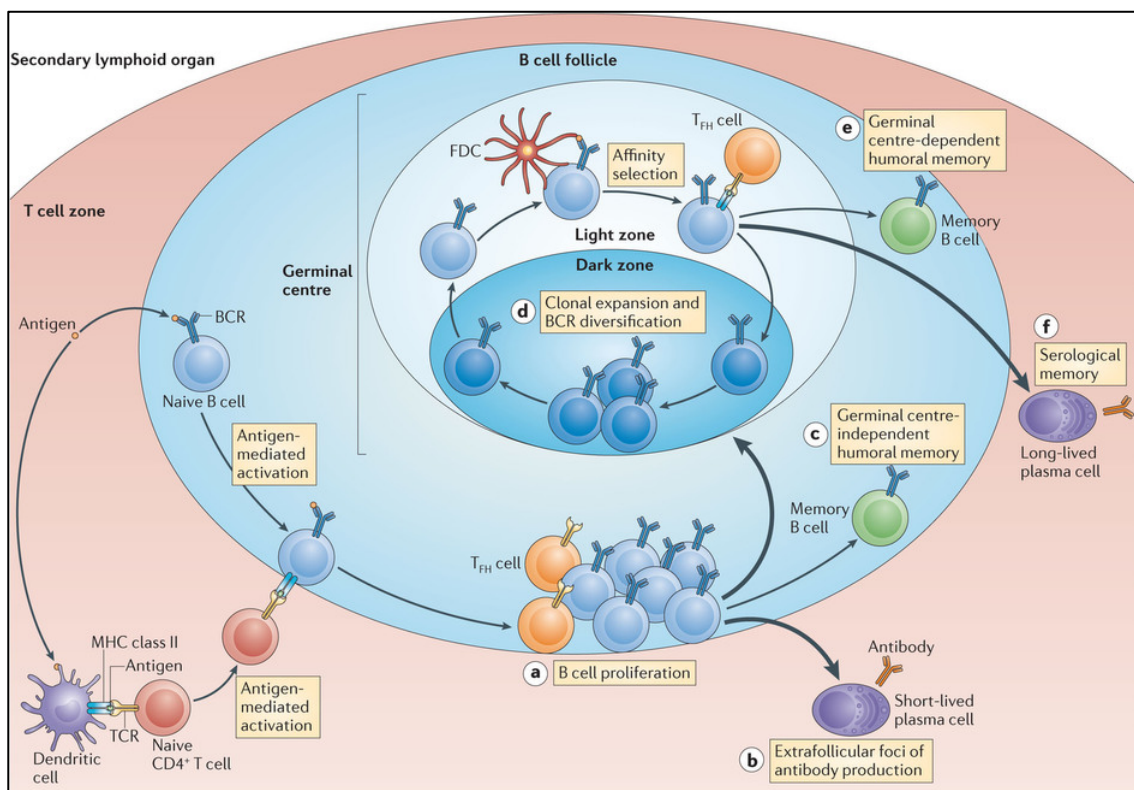


**Figura 7.** Papel de la IL17 en la patogénesis de la AR (Modificado de van den Berg & Miossec, 2009).

## 2.2 Linfocitos Thf.

Las células Thf son fundamentales para la regulación de la respuesta inmune. En la respuesta inmune primaria, las células Thf promueven la maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas (Igs) y el cambio de clase en las células B (Miller & Mitchell, 1968). En los órganos linfoides secundarios, tras la activación por antígeno y coestimulación por las células dendríticas, las células T migran a la frontera entre la zona de células B y la zona de células T (o regiones interfoliculares de los ganglios linfáticos), donde entran en contacto con las células B activadas por antígeno. El resultado de esta interacción es o bien la formación de CGs dentro del

folículo de células B o bien el desarrollo de focos extrafoliculares, donde células plasmáticas de vida corta producen anticuerpos (**Figura 8**) (Kurosaki et al., 2015). En ambas estructuras las células Thf promueven la maduración de células B, induciendo el cambio de clase y la maduración de la afinidad de las Igs, mediante la acción de citoquinas y moléculas de superficie. La respuesta en los CGs conduce a la maduración de células B de memoria y células plasmáticas de vida larga, proporcionando a largo plazo protección mediada por anticuerpos contra la reexposición a patógenos (Victora & Nussenzweig, 2012).



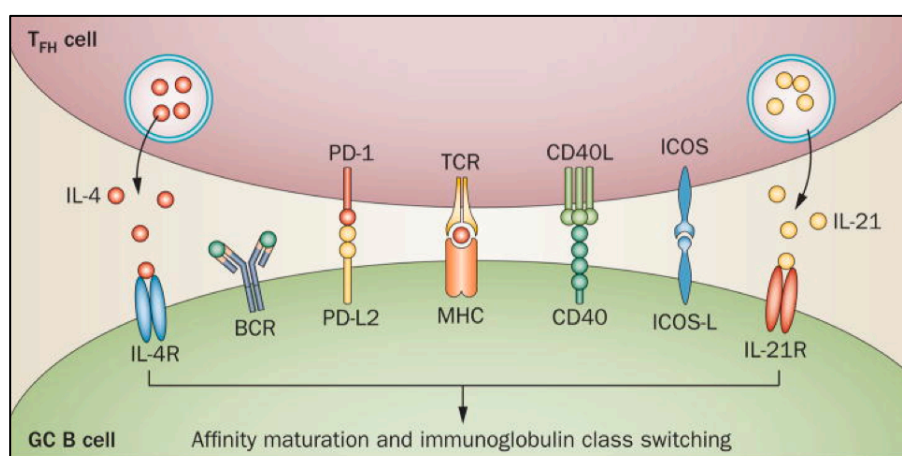
**Figura 8.** Reacciones en los órganos linfoides secundarios (Kurosaki et al., 2015).

Las células Thf se diferencian en los órganos linfoides secundarios a partir de un precursor común de células T CD4<sup>+</sup> *naïve* tras la estimulación antigénica (Campbell et al., 2001). Las células Thf se identificaron por primera vez como un subconjunto de células T CD4<sup>+</sup> aisladas de amígdalas humanas. Estas células expresaban el receptor de quemoquina 5 (CXCR5) e ICOS, y se localizaban dentro de los CGs (Schaerli et al., 2000). El CXCR5 fue descubierto en 1993 como un receptor acoplado a proteína G principalmente expresado por las células B (Dobner et al., 1992), y en 1996 se demostró que era decisivo para la migración de las células B a los folículos de los órganos linfoides en ratones (Förster et al., 1996). En la década del 2000, los estudios sobre las células T CD4<sup>+</sup> en amígdalas humanas, mostraron que las células que expresaban CXCR5 tenían una mayor capacidad para inducir *in vitro* la producción de Igs en las células B en comparación con las células T CD4<sup>+</sup> que carecían de expresión de CXCR5 (Breitfeld et al., 2000). Por otro lado, ICOS es una molécula esencial para la



generación de células Thf. Las señales mediadas por ICOS son importantes para la diferenciación de células Thf a dos niveles: la señalización de ICOS mediada por células dendríticas en la zona de células T induce en las células T la expresión de Bcl-6 (Choi et al., 2011), represor transcripcional esencial para la generación de células Thf (Nurieva et al., 2009); y por otro lado la señalización de ICOS mediada por células B del folículo en la frontera de las zonas de células T y B de los órganos linfoides secundarios, promueve la migración de los precursores de las Thf a los folículos (Xu et al., 2013).

Las células Thf proporcionan a las células B de los folículos señales de supervivencia y diferenciación a través de proteínas como el CD40 ligando (CD40L), el receptor inmunoinhibidor de muerte programada 1 (PD-1) y la citoquina IL 21 (**Figura 9**). El anclaje del CD40L expresado en células Thf al CD40 de las células B, promueve la proliferación y maduración de las células B (Casamayor-Palleja et al., 1995). Por otro lado, la IL21 producida por las células Thf se une al IL21R de las células B de los CGs y coopera con el receptor de células B (Bryant et al., 2007). Esta citoquina es esencial para el desarrollo y mantenimiento de los CGs y para el posterior desarrollo de las células productoras de anticuerpos (Zotos et al., 2010). Asimismo, junto con la IL 4, la IL 21 media el cambio de clase de las Igs (Ozaki et al., 2002). Por último, el PD-1 expresado en las células Thf, parece regular la actividad de este tipo celular en los CGs (Cubas et al., 2013). La señalización de PD-1 se realiza a través de sus ligandos PD L1 y PD L2 en las células B de los CGs. El PD-1 se requiere para la supervivencia de las células B en los CGs, y en última instancia, para la maduración hacia células plasmáticas (Good-Jacobson et al., 2010).



**Figura 9.** Interacciones entre células Thf y células B del CG (Craft, 2012).

Los estudios de la ontogenia y función de las células Thf en seres humanos están relativamente limitados debido a dificultades en la investigación y manipulación de las células Thf de los órganos linfoides secundarios, ya que sólo hay dos fuentes principales de células Thf

humanas: las amígdalas de los niños que han sufrido infecciones recurrentes de garganta, pero que son por lo demás sanos, y el bazo de los cadáveres de donantes de órganos.

Aunque las células Thf propiamente dichas están localizadas en los órganos linfoides secundarios, estudios recientes han descrito la existencia de posibles homólogos circulantes. Las células T CD4<sup>+</sup> en sangre que expresan CXCR5 fueron descritas por primera vez en humanos en 1994 (Förster et al., 1994). Diferentes trabajos muestran que las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de sangre expresan niveles más altos de IL-21 e IL-10 y son más eficientes en la inducción de la diferenciación de células B que las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> (Morita et al., 2011)(Chevalier et al., 2011). Estas observaciones muestran que las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de sangre comparten propiedades funcionales con las células Thf de los órganos linfoides (Schmitt et al., 2014). A diferencia de las células Thf de los CGs, las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> circulantes no expresan el factor de transcripción Bcl-6 (Morita et al., 2011)(Chevalier et al., 2011). Una posible explicación sería que el Bcl-6 no es necesario para la función de las Thf una vez que una célula T CD4<sup>+</sup> se ha comprometido a la vía celular Thf. Alternativamente, esta regulación negativa de Bcl-6 puede reflejar simplemente ligeras diferencias en las etapas de diferenciación de las células circulantes similares a Thf en comparación con las células Thf de los CGs. Por otra parte, *Bossaller et al.* (Bossaller et al., 2006) describieron en sujetos con deficiencias en CD40L o ICOS, una formación de CGs gravemente deteriorada debido a una disminución significativa de células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> en los CGs, que se veía acompañada de una frecuencia de células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> circulantes también disminuida. Estas observaciones obtenidas a partir de estudios de sujetos con inmunodeficiencias primarias, indican una posible relación entre las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de sangre y el linaje de Thf de los órganos linfoides.

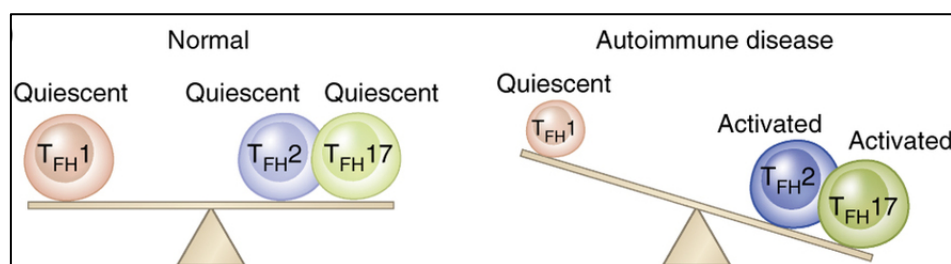
Las células T CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> circulantes constituyen aproximadamente el 20-25% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria circulantes en humanos (Chevalier et al., 2011). Aunque las estrategias y los marcadores de tinción seleccionados para definir los homólogos circulantes de las células Thf (Thfc) difieren entre laboratorios, algunas de las propuestas para su clasificación se basan en la expresión de las moléculas coestimuladoras ICOS y/o PD-1 (Simpson et al., 2010)(Chevalier et al., 2011) y otras en la presencia de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR6 (Morita et al., 2011).

Los primeros estudios sobre las células Thfc estaban basados en la expresión de ICOS y/o PD-1 en células CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> de sangre (Simpson et al., 2010) (Chevalier et al., 2011). Numerosos estudios describieron que la frecuencia de células CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> estaba aumentada en pacientes con enfermedades autoinmunes como LES, síndrome de Sjögren, AR, y enfermedades autoinmunes del tiroides (Simpson et al., 2010)(Li et al., 2012)(Wang et al., 2013)(Zhu et al., 2012). En varios de estos trabajos, el aumento de células CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> mostraba una correlación positiva con los títulos de autoanticuerpos en suero y con la actividad de la enfermedad y/o la gravedad (Simpson et al., 2010)(Zhu et al.,



2012).

Más recientemente, *Morita et al.* (Morita et al., 2011) describieron unas subpoblaciones de células Th<sub>fc</sub> en base a la expresión, en células CD4+CXCR5+ de sangre, de CXCR3 o CCR6, receptores de quimioquinas preferentemente expresados por células Th1 y Th17, respectivamente (Acosta-Rodriguez et al., 2007). En consecuencia, las células Th<sub>fc</sub> pueden subdividirse en tres subpoblaciones principales: células CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6, células CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6- y células CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6+. El subconjunto CXCR3+CCR6- expresa el factor de transcripción T-bet y produce citoquinas Th1 (IFN $\gamma$ ), por lo tanto se asemeja a células Th1 (en adelante denominadas células Thf-Th1). El subconjunto CXCR3-CCR6- expresa el factor de transcripción GATA3 y produce citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) por lo tanto se asemeja a células Th2 (de aquí en adelante llamadas células Thf-Th2). El subconjunto CXCR3-CCR6+ expresa el factor de transcripción ROR $\gamma$ T y produce citoquinas Th17 (IL-17 e IL-22) por lo tanto se asemeja a células Th17 (en lo sucesivo denominadas células Thf-Th17). En este trabajo de *Morita et al.* (Morita et al., 2011) donde las subpoblaciones de células Th<sub>fc</sub> aisladas fueron cocultivadas con células B en presencia de superantígeno, como la enterotoxina B estafilocócica, se demostró que las células Thf-Th2 y Thf-Th17 (subconjuntos CXCR3-) eran capaces de inducir la producción de Igs y el cambio de isotipo en las células B *naïve* a través de la secreción de IL-21, mientras que por el contrario las células Thf-Th1 (subconjuntos CXCR3+) carecían de capacidad para ayudar a las células B. Asimismo, mientras que las células Thf-Th2 promueven la secreción de IgE y IgG, las células Thf-Th17 son eficientes promoviendo la secreción de IgG e IgA. En pacientes con dermatomiositis juvenil, LES, síndrome de Sjögren y esclerosis múltiple, se encontró que la proporción de células Thf-Th1 entre las células Th<sub>fc</sub> estaba disminuida, mientras que la proporción de células Thf-Th2 y/o Thf-Th17 estaba aumentada. Además, se describió que dichas alteraciones se correlacionaban con la actividad de la enfermedad, los títulos de autoanticuerpos en suero, y/o la frecuencia de plasmablastos sanguíneos (Morita et al., 2011)(Le Coz et al., 2013)(Li et al., 2012)(Romme Christensen et al., 2013). En conjunto, estas observaciones indican que un aumento de células Thf-Th2 y/o Thf-Th17 y una disminución de células Thf-Th1 dentro del conjunto de células Th<sub>fc</sub> es un fenómeno común en varias enfermedades autoinmunes (**Figura 10**).



**Figura 10.** Alteración en el equilibrio de las subpoblaciones de células Thf (Ueno, 2015).



## ***OBJETIVOS***



Sobre la base de los antecedentes expuestos, nos propusimos estudiar las células Th17 y Thf en la patogenia de la AR con 5 objetivos fundamentales:

1. Estudiar la frecuencia y el fenotipo de las células Th17 en sangre periférica de pacientes con AR de reciente comienzo (ARo).
2. Determinar las posibles relaciones entre la frecuencia de células Th17 y los parámetros clínicos en AR.
3. Estudiar la función de las células T CD4+CXCR5+ de sangre periférica y de las subpoblaciones de Thfc.
4. Estudiar en pacientes con AR la frecuencia de:
  - Células Thfc (CD4+CXCR5+ICOS+)
  - Subpoblaciones de células Thfc:
    - Thf-Th1: CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6-
    - Thf-Th2: CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6-
    - Thf-Th17: CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6+
  - Plasmablastos circulantes (CD19+CD20-CD38<sup>high</sup>)
5. Establecer las posibles relaciones entre la frecuencia de células Thfc y las subpoblaciones Thfc con los parámetros clínicos en AR.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***





## **1. PACIENTES**

En este epígrafe describimos las características más relevantes de los pacientes que han intervenido en cada estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Los pacientes con AR fueron diagnosticados según criterio del ACR, es decir, si cumplían al menos 4 de los criterios de la revisión de 1987 (Arnett et al., 1988).

### **1.1 Características de los pacientes con AR que donaron sangre periférica y líquido sinovial para obtener linfocitos T en el estudio de linfocitos Th17**

Se obtuvo sangre periférica de 33 pacientes con AR de reciente comienzo (ARo) y de 53 voluntarios sanos pareados para edad y sexo. Se incluyeron solamente pacientes con ARo con una duración de la enfermedad inferior a 6 meses y que no hubiesen recibido nunca ningún FAME o corticosteroide. Los datos clínicos se resumen en la **Tabla 1**.

Ocho de los pacientes con ARo ACPA+ donaron sangre periférica por segunda vez un año después de haber iniciado el tratamiento. Los pacientes habían recibido MTX oral a dosis de 10 a 25 mg semanalmente, además 6 de los 8 pacientes recibían prednisona 2,5 mg diariamente. De estos 8 pacientes 4 habían alcanzado la remisión completa, definida por una puntuación de la actividad de la enfermedad (DAS28) inferior a 2,6 (Balsa et al., 2004) y los otros 4 pacientes experimentaron una mejoría clínica significativa, con un descenso en el DAS28 de 2 puntos, pero todavía mostraban una actividad significativa de la enfermedad asociada a un DAS28 > 2,6. Asimismo, se obtuvo sangre periférica también a partir de los 8 sujetos sanos que habían actuado previamente como controles para estos pacientes.

Por otro lado se obtuvo líquido sinovial de 20 pacientes con AR establecida, los cuales estaban en tratamiento con MTX oral y dosis bajas de prednisona y sangre periférica de 20 pacientes con AR establecida en tratamiento con MTX oral y dosis bajas de prednisona. Los datos clínicos se resumen en la **Tabla 1**.

|                                   | ARo (n = 33)  | ARo al año (n = 8) | AR (n = 20)   | LSAR (n=20) |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|---------------|-------------|
| Edad (años); mediana (RIQ)        | 55 (42,5–65)  | 52 (43–64,5)       | 53 (42–61)    | 65 (49–73)  |
| Mujeres; n (%)                    | 30 (91)       | 7 (88)             | 18 (90)       | 18 (90)     |
| DAS28; mediana (RIQ)              | 4,8 (4,1–5,8) | 2,7 (1,5–4,2)      | 2,9 (1,6–4,2) | 3,1 (2–5,8) |
| FR+; n(%)                         | 17 (52)       | 7 (88)             | 11 (55)       | 13 (65)     |
| ACPA+; n (%)                      | 15 (45)       | 8 (100)            | 11 (55)       | 11 (55)     |
| MTX; n (%)                        | -             | 8 (100)            | 19 (95)       | 20 (100)    |
| Prednisona $\leq$ 5 mg/día; n (%) | -             | 6 (75)             | 6 (30)        | 4 (20)      |

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con AR.** ARo: pacientes con AR de reciente comienzo; AR: pacientes con AR establecida; LSAR: Líquido sinovial de pacientes con AR. RIQ, rango intercuartil.

## 1.2 Características de los pacientes con AR que donaron sangre periférica para obtener linfocitos T en el estudio de linfocitos Thf

Se obtuvo sangre periférica de 34 pacientes con AR con enfermedad establecida y de 34 controles sanos de edad y sexo similares. Los pacientes con AR estaban recibiendo tratamiento con MTX oral, con o sin dosis bajas de prednisona. Entre los pacientes con AR, 17 se encontraban en remisión según lo definido por una puntuación DAS28  $<2,6$  (AR-r) y 17 tenían una enfermedad activa con una puntuación DAS28  $> 2,6$  (AR-a) (Prevoo et al., 1995). Todos los pacientes eran positivo para FR y/o ACPA. Los datos clínicos se resumen en la **Tabla 2**.

|                                   | AR-a (n = 17) | AR-r (n = 17)  |
|-----------------------------------|---------------|----------------|
| Edad (años); mediana (RIQ)        | 57 (54–63,5)  | 53,5 (44–57,5) |
| Mujeres; n (%)                    | 16 (94)       | 13 (76,5)      |
| DAS28; mediana (RIQ)              | 3,4 (3–4,4)   | 2 (1,7–2,4)    |
| FR+; n(%)                         | 16 (94)       | 16 (94)        |
| ACPA+; n (%)                      | 14 (82)       | 14 (82)        |
| MTX; n (%)                        | 17 (100)      | 17 (100)       |
| Prednisona $\leq$ 5 mg/día; n (%) | 11 (65)       | 4 (24)         |

**Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con AR-a y AR-r.** AR-a: pacientes con AR y enfermedad activa (DAS28  $> 2,6$ ); AR-r: pacientes con AR en remisión (DAS28  $< 2,6$ ). RIQ, rango intercuartil.

## 2. CULTIVOS CELULARES

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Se utilizaron cultivos primarios de linfocitos T y B.

### 2.1 Cultivos primarios

Los linfocitos al madurar adquieren y/o eliminan proteínas de superficie llamadas antígenos linfocitarios. Se les denomina “CD” (*cluster of differentiation*) y su conjunto define a las distintas poblaciones de linfocitos (Sallusto et al., 1999). Gracias a estos marcadores de superficie, fuimos capaces de aislar las poblaciones de linfocitos T y linfocitos B necesarias para nuestros estudios.

- Linfocitos Th: CD3+, CD4+
- Linfocitos B *naïve*: CD19+, CD27-

#### 2.1.1 Purificación de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD4+CXCR5+ y subpoblaciones de linfocitos Thfc

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) y del líquido sinovial se separaron inmediatamente después de la recogida de muestras, por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Los linfocitos CD4+ se aislaron, a partir de CMSPs recién aisladas, en un Automacs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) utilizando el kit de inmunoselección magnética negativa “CD4+ T Cell Isolation Kit II” (Miltenyi Biotec) que contiene un cocktail de anticuerpos biotinilados frente a CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y  $\gamma/\delta$  TCR y Glicoforina A, seguido de un anticuerpo anti-biotina marcado con microesferas magnéticas. El porcentaje de células positivas para CD4+ resultó superior al 98%, y no se detectaron monocitos CD14+, linfocitos T CD8+, células NK CD56+, linfocitos B CD19+, ni Linfocitos T  $\gamma/\delta$ , indicativo de una alta pureza en la población.

Los linfocitos T CD4+CXCR5+ fueron aislados por inmunoselección magnética positiva a partir de células T CD4+ totales utilizando un AcMc conjugado directamente con fluorocromo PE “phycoerythrin” anti-CXCR5 (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) seguido de un anticuerpo anti-PE marcado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). El porcentaje de células CD4 positivas para CXCR5+ resultó superior al 98%. Posteriormente, las subpoblaciones de linfocitos Thfc fueron seleccionadas a partir de células T CD4+CXCR5+ totales en un citómetro de flujo FACSVantage SE (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) tras la tinción con CXCR3 y CCR6. El proceso de seleccionado fue dirigido a aislar células T

CXCR5+CXCR3+CCR6- (células Thf-Th1), células T CXCR5+CXCR3-CCR6- (células Thf-Th2) y células T CXCR5+CXCR3-CCR6+ (células Thf-Th17).

### 2.1.2 Purificación de linfocitos B naïve

Los linfocitos B CD19+ se aislaron, a partir de CMSPs recién aisladas, en un Automacs (Miltenyi Biotec) utilizando el kit de inmunoselección magnética negativa “B Cell Isolation Kit II” (Miltenyi Biotec) que contiene un cocktail de anticuerpos biotinilados frente a CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y Glicoforina A, seguido de un anticuerpo anti-biotina marcado con microesferas magnéticas. El porcentaje de células positivas para CD19+ resultó superior al 98%, indicando una alta pureza de la población. Los linfocitos B *naïve* fueron aislados a partir de linfocitos B CD19+ totales mediante inmunoselección magnética negativa con anticuerpos anti-CD27 marcados con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). El porcentaje de células negativas para CD27 resultó superior al 98%.

## 2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, en RPMI 1640 (Lonza, Alendale, NJ, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 50 U/ml penicilina, 50 g/ml estreptomicina y 50 mM 2-mercapto-etanol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY Carlsbad, CA, EE.UU) al que denominaremos *medio completo*. Las placas fueron de Corning (Cambridge, MA, EE.UU).

### 2.2.1 Cultivo linfocitos T CD4+ en estudio de linfocitos Th17

Inmediatamente después de su aislamiento, las células T CD4+ se cultivaron y se estimularon en placas de 24 pocillos (10<sup>6</sup> células / pocillo) en *medio completo*. Se realizaron dos estrategias de activación diferentes:

- A. Periodo de corto plazo, donde las células T CD4+ se estimularon durante 16 horas con acetato de forbol miristato (PMA) (10 nM) e ionomicina (2 µM), en presencia o ausencia de monensina (4 µM) las ultimas 6 horas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).
- B. Periodo de largo plazo, donde las células T CD4+ se cultivaron durante 4 días en presencia de los AcMc solubles anti-CD3 subclase IgE (T3 / 4.E, Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) (0,5 µg/ml) anti-CD28 (1 µg/ml) y anti-CD49d (1 µg/ml) (BD Pharmingen) reestimuladas durante los últimos 6 horas de cultivo con PMA e ionomicina.

### 2.2.2 Cocultivo entre linfocitos T CD4+CXCR5+, CD4+CXCR5- o las subpoblaciones de Thfc (Thf-Th1, Thf-Th2 o Thf-Th17) y linfocitos B Naïve (CD19+CD27-) autólogos en estudio de linfocitos Thf

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la variación entre ellos fue menor del 5%. La relación celular en todos los cocultivos fue de 1:1. Se sembraron a una concentración de  $5 \times 10^4$ :  $5 \times 10^4$  en placas de 96 pocillos con fondo en U *en medio completo*. Los cocultivos se mantuvieron durante 13 días. Se añadió a los cultivos endotoxina reducida de enterotoxina estafilocócica B (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich), ya que la producción de Ig en cocultivos de linfocitos Thf/B se ha demostrado que depende de interacciones cognadas entre linfocitos T y linfocitos B (Simpson et al., 2010). El medio de cultivo se cambió cada 4 días de la siguiente forma: se retiró el medio de cultivo y se centrifugó; los linfocitos T y linfocitos B que permanecieron en el fondo se resuspendieron en 50% de medio nuevo y 50% del sobrenadante que habíamos retirado previamente. El día 13, los sobrenadantes se recogieron, se filtraron y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para usarlos posteriormente en la determinación de IgA, IgG e IgM.

## 3. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para las tinciones de marcadores fenotípicos de superficie en un paso, las células se incubaron durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  con el AcMc conjugado directamente con fluorocromo. Todos estos anticuerpos conjugados fueron de BD Pharmingen. Con FITC “fluorescein isothiocyanate” (anti-CD8, anti-CD20), con Alexa Fluor 448 (anti-CXCR3), con PE “phycoerythrin” (anti-CCR6, anti-CD4, anti-ICOS, anti-CD27), con PerCP “peridinin chlorophyll protein” (anti-CD3, anti-PD-1, anti-CD19), con APC “allophycocyanin” (anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD38) y con Alexa Fluor 647 (anti-CXCR5). Tras lavar las muestras con suero fetal bovino al 2% y azida sódica al 0,01% diluidos en tampón fosfato salino (2%FBS/0.01%NaN<sub>3</sub>/PBS), se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU).

Para la detección de citoquinas intracelulares se añadió Monensina (4µM) durante las últimas 6 horas de cultivo con el fin de paralizar el tráfico intracelular y la secreción de citoquinas. A continuación, las células fueron recogidas, lavadas con 2%FBS/0.01%NaN<sub>3</sub>/PBS y permeabilizadas utilizando la solución permeabilizante “FACS permeabilizing solution 2” (BD Pharmingen) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron una segunda vez y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con los siguientes AcMc conjugados directamente con fluorocromo: FITC (anti-TNFα mAb clone Mab11, BD Pharmingen), con PE (anti-IL17A clon eBio64DEC17, eBioscience, anti-IL10 clone B-T10, Miltenyi Biotech), con PerCP (anti-CD3,

BD Pharmingen) o con APC (IFN $\gamma$  mAb clon B27, BD Pharmingen). Después se lavaron con 2%FBS/0.01%NaN<sub>3</sub>/PBS y seguidamente con PBS. Las células se fijaron con PFA al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur usando el software CellQuest (BD Biosciences).

#### **4. ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”)**

Los niveles de las distintas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos libres de restos celulares, se determinaron mediante kits comerciales de ELISA. Para medir la concentración de IL-17 utilizamos un kit de eBioscience y para el TNF $\alpha$ , la IL-10 y el IFN $\gamma$  utilizamos kits de BD Bioscience. Todos los ELISAs se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Las concentraciones de Igs se midieron en placas de 96 pocillos (MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) que se recubrieron durante toda la noche a 4°C con 10  $\mu$ g/ml de un AcMc de ratón anti-humano IgG, IgA o IgM (ABD Serotec, Munich, Alemania). Posteriormente se bloqueó con 2% de BSA/PBS durante 1 hora y continuación las curvas de calibración de IgG, IgA o IgM humana (Sigma-Aldrich) junto con los sobrenadantes de cultivo diluidos en 2% BSA/PBS se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Por último se lavó y se reveló con AcMc de cabra anti-humano IgG, IgA o IgM conjugado con HRP (AbD serotec) seguido de solución de sustrato TMB (Pierce Biotecnología, Rockford, IL, EE.UU.). Finalmente la absorbancia se midió a 450nm en un lector de microplacas Synergy H4 Hybrid Multi-Mode (BioTec Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.).

#### **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis test. Las muestras pareadas se compararon empleando el test de los signos de Wilcoxon. Aplicamos la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones cuando fue necesario. Las correlaciones se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis se realizaron con la versión 5.0 del software Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## ***RESULTADOS***





## **A. LINFOCITOS Th17 EN LA PATOGENIA DE LA AR**

### **A.1 FRECUENCIA Y FENOTIPO DE LINFOCITOS Th17**

#### **A.1.1. Expresión de IL-17 en células T CD4+ en pacientes con AR**

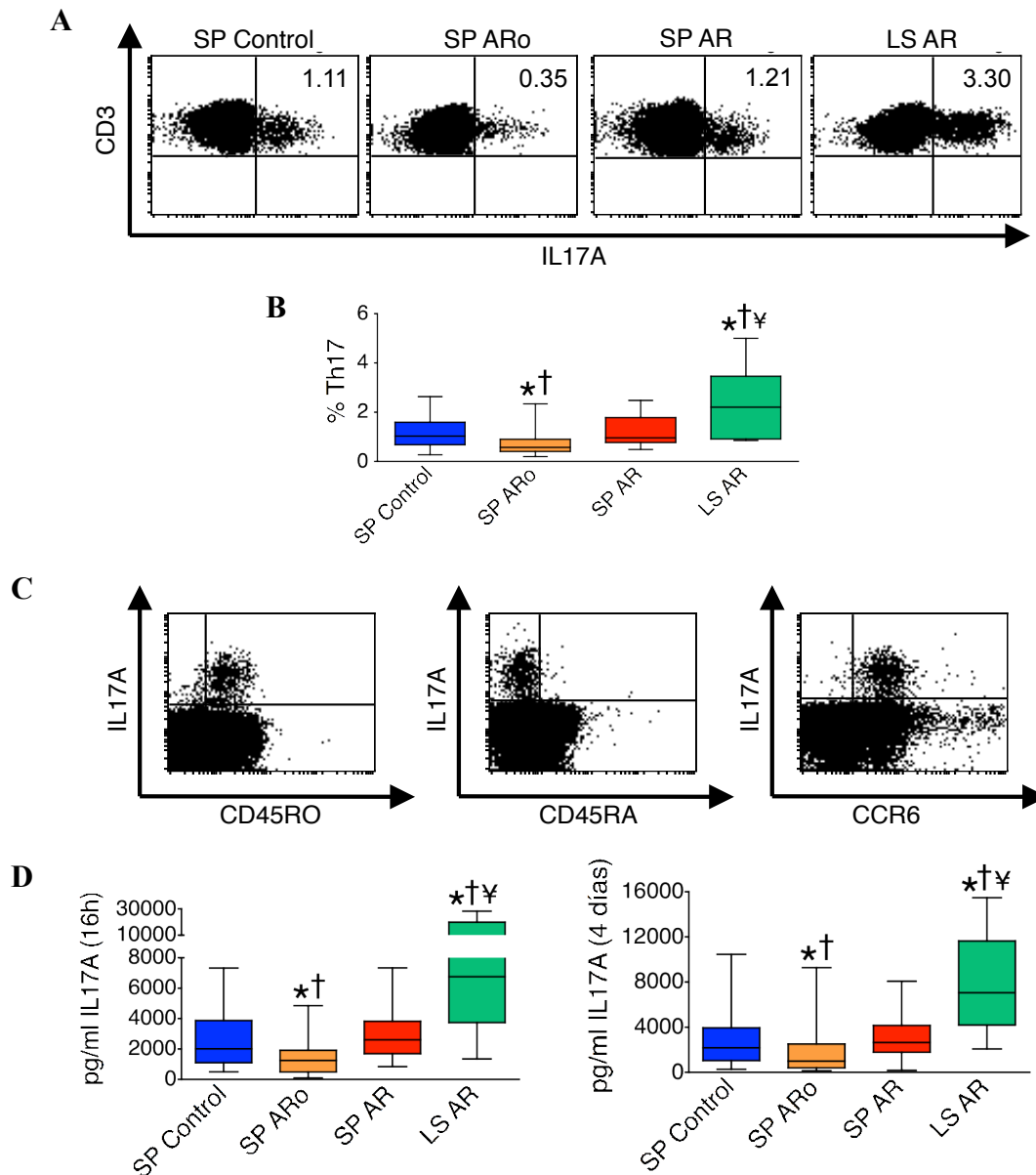
Nuestro objetivo inicial fue estudiar en células T CD4+ de pacientes con AR, citoquinas y marcadores fenotípicos de superficie característicos de linfocitos Th17.

La frecuencia de células Th17 circulantes, determinada por la expresión de IL-17, estaba disminuida significativamente en los pacientes con ARo (0,57%, 0,41-0,91%) (mediana, rango intercuartil) en comparación con los controles sanos (1,02%, 0,76-1,51%) (**Figura 1 A y B**). Al mismo tiempo, el porcentaje de células Th17 en pacientes con AR establecida (0,96%, 0,77-1,79%) no era diferente al de los controles. Por el contrario, la frecuencia de células Th17 encontrada en el líquido sinovial de pacientes con AR establecida (2,20%, 0,91-3,46%) estaba aumentada en comparación con la frecuencia de células Th17 circulantes de sangre periférica de controles, pacientes con ARo y pacientes con AR establecida (**Figura 1 A y B**). Todas las células Th17 expresaron el marcador fenotípico de memoria CD45RO, fueron negativas para CD45RA y positivas para la expresión de CCR6 (**Figura 1C**). Es importante destacar que la proporción de células T CD4+ circulantes totales no fue diferente entre los pacientes con ARo y los controles.

En paralelo, la concentración de IL-17 detectada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de células T CD4+ estimuladas 16 horas con PMA/ionomicina de pacientes con ARo (1247, 472-1.911 pg/ml) estaba disminuida significativamente en comparación con los controles sanos (2453, 1.455-4.012 pg/ml) (**Figura 1D**), y estos resultados se detectaron no sólo cuando las células se estimularon 16 horas, sino también tras la estimulación durante 4 días con anti-CD3/CD28/CD49d (976, 383-2.451 pg/ml pacientes con ARo vs 2.130, 1.019-3.525 pg/ml controles sanos) (**Figura 1D**). Sin embargo en pacientes con AR establecida, la secreción de IL-17 por parte de células T CD4+ de sangre periférica no era diferente de los controles (2.594, 1.693-3.813 pg/ml tras 16 h de estimulación y 2.593, 1.734-4.088 pg/ml a los 4 días de estimulación). Por el contrario, las células T CD4+ del líquido sinovial de pacientes con AR establecida mostraron una secreción de IL-17 aumentada (6.757, 3.724-19.800 pg/ml después de 16 h de estimulación y 6.933, 4.128-11.420 pg/ml tras 4 días de estimulación), en comparación con las células T CD4+ de sangre periférica de controles sanos, pacientes con ARo y pacientes con AR establecida (**Figura 1D**).

Debido a que varios estudios han descrito la producción de IL-17 por otras poblaciones celulares diferentes a los linfocitos Th17 (Pöllinger et al., 2011)(Suurmond et al., 2011), cultivamos CMSPs tras la depleción completa de células T CD4+ y no fuimos capaces de

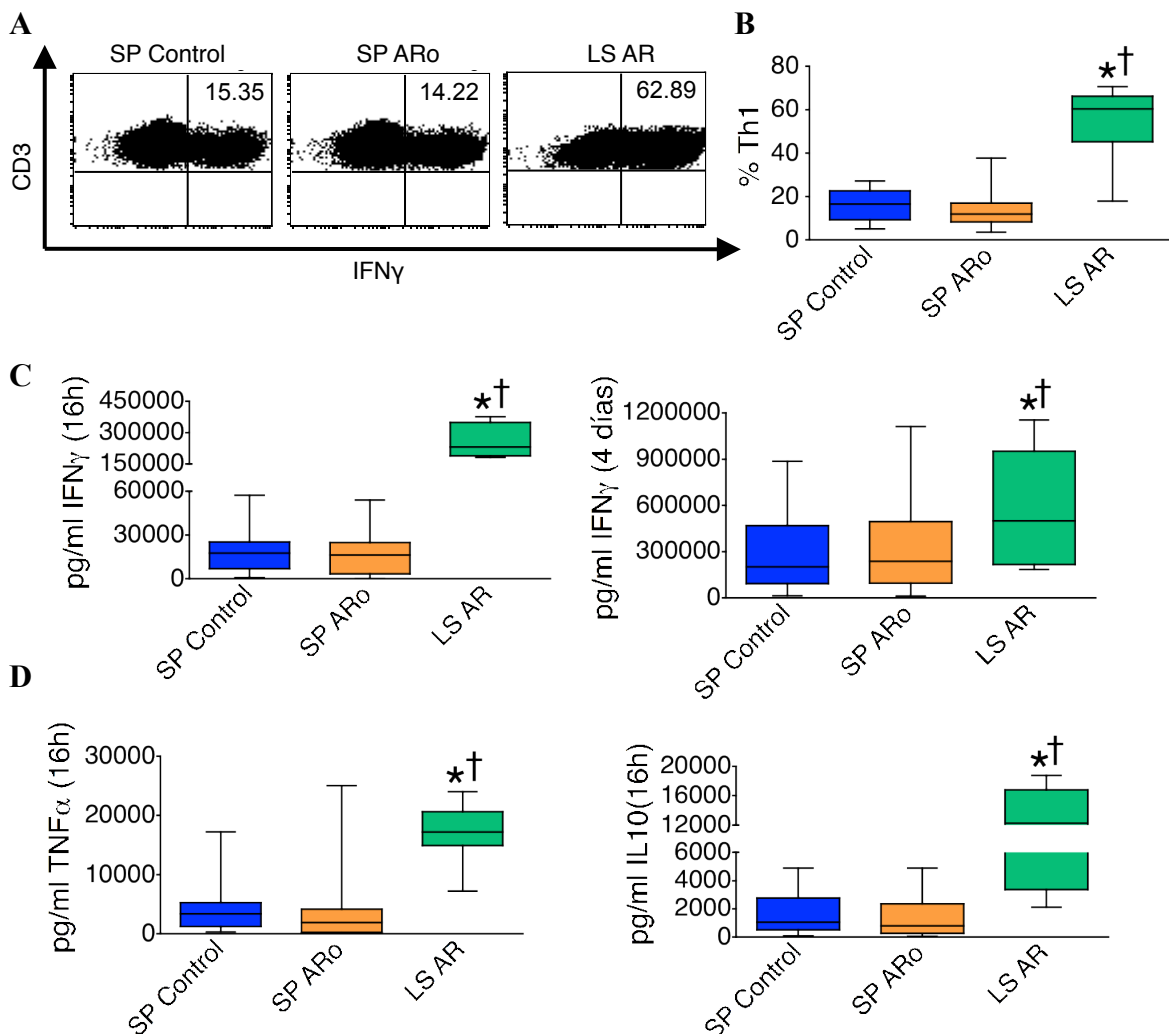
detectar IL-17 en los sobrenadantes de cultivo tras periodos de estimulación a corto o largo plazo, de acuerdo con el trabajo publicado por *Shen et al* (Shen et al., 2009).



**Figura 1. Frecuencia y fenotipo de linfocitos Th17 en AR.** Células T CD4<sup>+</sup> fueron aisladas de sangre periférica de controles sanos (SP Control), pacientes con ARo (SP ARo), pacientes con AR establecida (SP AR) y de líquido sinovial de pacientes con AR establecida (LS AR), y estimuladas con PMA/ionomicina durante 16 horas o con anti-CD3/CD28/CD49d durante 4 días. **A.** Diagramas de puntos representativos de la expresión de IL17A en células T CD4<sup>+</sup>. Debido a que la molécula CD4 se regula negativamente tras la estimulación con PMA, se muestra la expresión de CD3. **B.** Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresan IL-17A (células Th17), determinado por citometría de flujo, tras 16 horas de estimulación. **C.** Diagramas de puntos de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de CD45RO, CD45RA y CCR6 frente a IL-17A en células T CD4<sup>+</sup> aisladas. **D.** Secreción de IL-17A al medio de cultivo, de células T CD4<sup>+</sup> estimuladas durante 16 horas (**izquierda**) o 4 días (**derecha**). En B y D, los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de sangre periférica de 53 controles sanos, 33 pacientes con ARo, 20 pacientes con AR establecida y LS de 20 pacientes con AR establecida. \* P < 0,05 vs SP Control; † p < 0,05 vs SP AR; ¥ p < 0,05 vs SP ARo.

### A.1.2. Expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ e IL-10 en células T CD4+ en pacientes con AR

Por otro lado quisimos estudiar la frecuencia de células T CD4+ circulantes productoras de IFN $\gamma$  (Th1), la cual fue comparable entre pacientes con ARo (11,88, 8,22-17,50%) (mediana, rango intercuartil) y los controles sanos (16,58, 9,25-22,64%) (**Figura 2 A y B**). Asimismo, no se observaron diferencias entre estos dos grupos en la determinación de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 en los sobrenadantes de células T CD4+ estimuladas (**Figura 2 C y D**). Por el contrario, cuando se compararon células T CD4+ aisladas de líquido sinovial de pacientes con AR establecida con células T CD4+ de sangre periférica de controles sanos y pacientes con ARo, se observó una frecuencia aumentada de células Th1 junto con una secreción incrementada de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  o IL-10 en el líquido sinovial de pacientes con AR establecida (**Figura 2 A-D**).

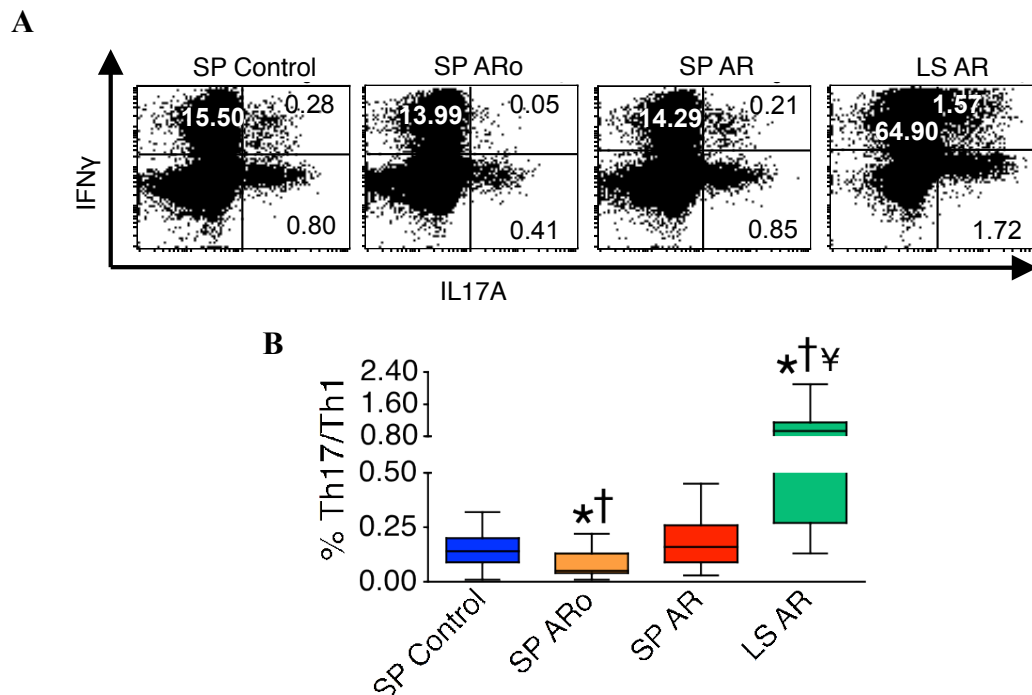


**Figura 2. Expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 en células T CD4+ en AR.** Células T CD4+ fueron aisladas de sangre periférica de controles sanos (SP Control), pacientes con ARo (SP ARo) y de líquido sinovial de pacientes con AR establecida (LS AR), y estimuladas con PMA/ionomicina durante 16 horas o con anti-CD3/CD28/CD49d durante 4 días. **A.** Diagramas de puntos representativos de la expresión de IFN $\gamma$  en células T CD4+. **B.** Porcentaje de células T CD4+ que expresan IFN $\gamma$  (células Th1), determinado por citometría de flujo, tras 16 horas de estimulación. **C.** Secreción de IFN $\gamma$  al medio de cultivo, de células T CD4+ estimuladas durante 16 horas (**izquierda**) o 4 días (**derecha**). **D.** Secreción de TNF $\alpha$  e IL-10 al medio de cultivo, de células T CD4+ estimuladas durante 16 horas. Los diagramas de caja

representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de sangre periférica de 53 controles sanos, 33 pacientes con ARo y líquido sinovial de 20 pacientes con AR establecida. \* P <0,05 vs SP Control; † p <0,05 vs SP ARo.

### A.1.3. Frecuencia de células Th17/Th1 en pacientes con AR

El porcentaje de células que producían simultáneamente IL-17 e IFN $\gamma$  (células Th17/Th1) (Acosta-Rodriguez et al., 2007), fue significativamente menor en los pacientes con ARo (0,05, 0,04-0,13%) en comparación con los controles sanos (0,14, 0,09-0,20%) (mediana, rango intercuartil) (**Figura 3 A y B**). Por el contrario, la frecuencia de células Th17/Th1 circulantes en pacientes con AR establecida (0,16, 0,09-0,26%) no fue diferente de los controles. Al mismo tiempo, el porcentaje de células Th17/Th1 fue más alto en el líquido sinovial de pacientes con AR establecida (0,93, 0,27-1,15%) en comparación con la sangre periférica de controles, de pacientes con ARo y de pacientes con AR establecida (**Figura 3 A y B**).



**Figura 3. Frecuencia de células Th17/Th1 en AR.** Células T CD4<sup>+</sup> fueron aisladas de sangre periférica de controles sanos (SP Control), pacientes con ARo (SP ARo), pacientes con AR establecida (SP AR) y de líquido sinovial de pacientes con AR establecida (LS AR), y estimuladas con PMA/ionomicina durante 16 horas. **A.** Diagramas de puntos representativos de la expresión de IL17A e IFN $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup>. **B.** Porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que expresan tanto IL-17A como IFN $\gamma$  (células Th17/Th1), determinado por citometría de flujo. Los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de sangre periférica de 53 controles sanos, 33 pacientes con ARo, 20 pacientes con AR establecida y líquido sinovial de 20 pacientes con AR establecida. \* P <0,05 vs SP Control; † p <0,05 vs SP AR; ‡ p <0,05 vs SP ARo.

## A.2 LINFOCITOS Th17 EN LA CLÍNICA DE LA AR

### A.2.1. Relación entre los linfocitos Th17 circulantes y parámetros clínicos en AR

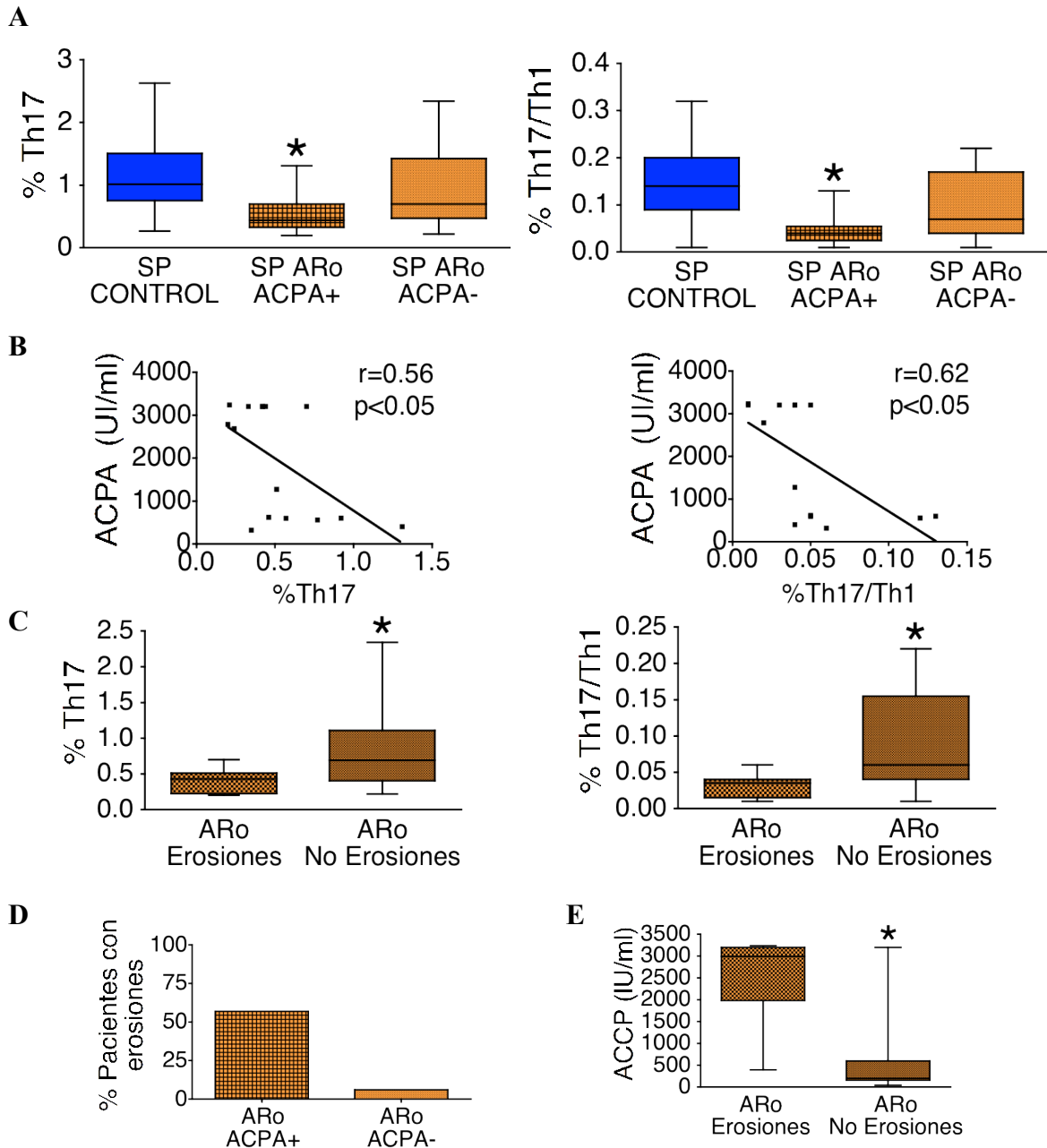
Decidimos analizar, en nuestros pacientes con AR, si existía alguna relación entre la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes y determinados parámetros clínicos característicos de AR. La observación más sorprendente se produjo tras la subdivisión de pacientes con ARo en dos grupos en función de la presencia o ausencia de ACPA. Los pacientes con ARo positivos para ACPA tuvieron una frecuencia significativamente menor de células circulantes Th17 (0,44, 0,33-0,70%) y Th17/Th1 (0,04, 0,03-0,05%), en comparación con los controles sanos (como se señaló anteriormente: Th17 1,02%, 0,76-1,51% y Th17/Th1 0,14, 0,09-0,20%) (**Figura 4A**). Por el contrario, el porcentaje de células Th17 (0,70, 0,48-1,43%) y de Th17/Th1 (0,07, 0,04-0,18%) en los pacientes con ARo negativas para ACPA no fue estadísticamente diferente a los controles (**Figura 4A**). Es de destacar que en los pacientes con AR establecida, la frecuencia de Th17 y Th17/Th1 circulantes no fue diferente a los controles, ni para pacientes ACPA+ (Th17 0,95, 0,59-1,69%, Th17/Th1 0,15, 0,08-0,29) ni ACPA- (Th17 1,31, 0,77-1,99, Th17/Th1 0,17, 0,1-0,28).

Fue muy interesante observar que los pacientes con ARo ACPA+ mostraban una correlación negativa significativa entre los títulos de ACPA y la frecuencia de células Th17 circulantes, y también entre los títulos de ACPA y la frecuencia de células Th17/Th1 circulantes (**Figura 4B**). Esta correlación no se observó en los pacientes con AR establecida ACPA+.

Por otra parte, al dividir los pacientes con ARo de acuerdo a la presencia o ausencia de erosiones óseas basales en las radiografías de manos y pies, se observó una frecuencia significativamente menor de células Th17 y Th17/Th1 circulantes en pacientes con enfermedad erosiva (Th17 0,43, 0,22-0,51% ; Th17/Th1 0,03, 0,01-0,04%) frente a pacientes con enfermedad no erosiva (Th17 0,69, 0,41-1,02%; Th17/Th1 0,06, 0,04-0,16%) (**Figura 4C**). Sin embargo, tras ajustar por la positividad para ACPA, era evidente que este hecho estaba vinculado a la fuerte relación entre los ACPA y las erosiones (Syversen et al., 2010). De ahí que, el porcentaje de pacientes que presentan enfermedad erosiva fuese mucho mayor en pacientes con ARo ACPA+ (57%) en comparación con los ACPA- (6%) (**Figura 4D**). Además, entre los pacientes con ARo ACPA+, se observó que los títulos de ACPA eran significativamente más elevados en los pacientes que presentaban erosiones (2.993, 1.628-3.200 UI/ml) frente a los pacientes sin erosiones basales (199, 164-596 UI/ml) (**Figura 4D**).

No se observaron diferencias en la frecuencia de células Th17 o Th17/Th1 circulantes entre los pacientes con ARo o AR establecida FR (+) y FR (-). Igualmente, no se observaron correlaciones significativas entre la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes y el título de FR, el índice de actividad DAS 28, la edad, la velocidad de sedimentación globular

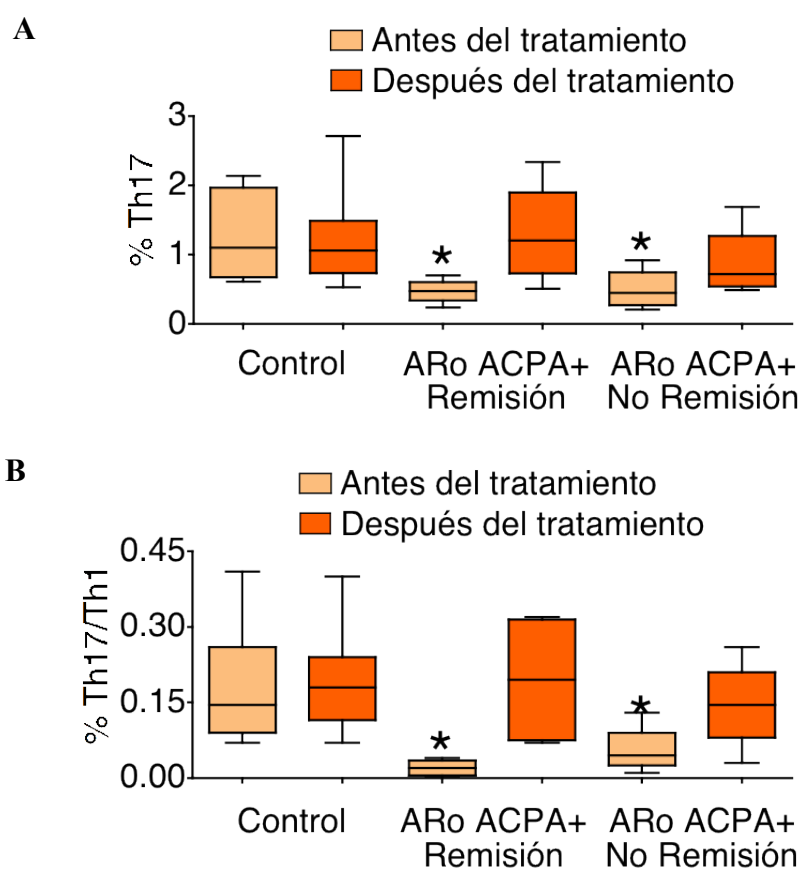
(VSG), o la proteína C reactiva (PCR), ni en pacientes con ARo ni en pacientes con AR establecida.



**Figura 4. Relación de la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes con los ACPA y las erosiones basales en ARo.** **A.** Frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 presentes en las células T CD4+ aisladas de sangre periférica de controles sanos (SP Control), pacientes con ARo ACPA+ y pacientes con ARo ACPA-. \*  $P < 0,05$  vs SP Control. **B.** Correlación lineal entre el porcentaje de células Th17 o Th17/Th1 circulantes y los títulos de ACPA en pacientes con ARo ACPA+. **C.** Frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 en sangre periférica de pacientes con ARo que presentaban o no erosiones en la 1ª visita. \*  $P < 0,05$  frente a pacientes con erosiones. **D.** Porcentaje de pacientes con ARo ACPA+ o ACPA- que presentaban erosiones en la 1ª visita. **E.** Títulos de ACPA en pacientes con ARo ACPA+ que presentaban o no erosiones en la 1ª visita. \*  $P < 0,05$  frente a los pacientes con erosiones en la 1ª visita. Los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos calculados a partir de sangre periférica de 53 controles sanos, 15 pacientes con ARo ACPA+ y 18 pacientes con ARo ACPA- en A y D, y 9 pacientes con ARo con erosiones en la 1ª visita y 24 pacientes con ARo sin erosiones en la 1ª visita en C.

### A.2.2. Efecto *in vivo* del tratamiento sobre la frecuencia de linfocitos Th17 y Th17/Th1 circulantes en AR

Cuando revaluamos a los pacientes un año después y tras estar recibiendo tratamiento con MTX oral con o sin dosis bajas de prednisona, fue interesante observar que la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes en pacientes con ARo ACPA+ ya no era diferente de la de los controles sanos (**Figura 5 A y B**), y esto no solo se halló en pacientes que habían alcanzado la remisión, sino también en pacientes que tenían actividad persistente de la enfermedad. La variación experimental en los controles fue mínima al comparar los datos obtenidos en la primera visita frente a la segunda (**Figura 5 A y B**).

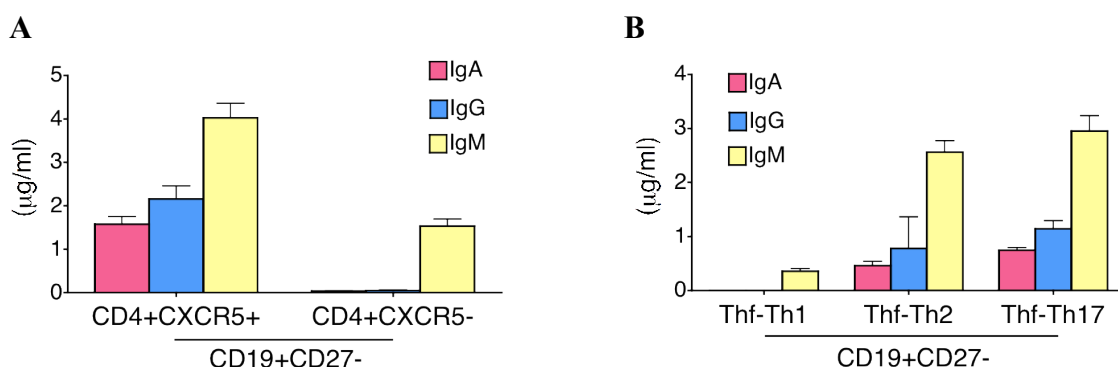


**Figura 5. Efecto *in vivo* del tratamiento sobre la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes.** 8 pacientes con ARo ACPA+ donaron sangre por segunda vez, un año después de la primera visita. 4 de estos pacientes habían conseguido la remisión y 4 de ellos mostraban una actividad de la enfermedad persistente. **A y B.** Frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes en pacientes con ARo ACPA+ que alcanzaron la remisión (ARo ACPA+ remisión), pacientes con ARo ACPA+ que no alcanzaron la remisión (ARo ACPA+ No Remisión) y controles sanos (n=8), observados en la primera visita (antes del tratamiento) y en la visita de seguimiento tras un año (después del tratamiento). Los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil y los valores máximos y mínimos. \* P < 0,05 vs Control.

## B. LINFOCITOS Thf EN LA PATOGENIA DE LA AR

### B.1 CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS CD4+CXCR5+ Y LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Thf

Nuestro primer objetivo fue examinar la capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+. Para ello se realizó el cocultivo durante 13 días, de células T CD4+CXCR5+ o células T CD4+CXCR5- con células B *naïve* (CD19+CD27-) autólogas, aisladas de sangre periférica de 5 controles sanos. Se determinó la secreción de Ig A e IgG en los sobrenadantes del cocultivo como un indicador de maduración de células B. En los sobrenadantes de los cocultivos de células B *naïve* con células T CD4+CXCR5+ se detectaron tanto IgA como IgG e IgM, mientras que en los sobrenadantes de cocultivos con células T CD4+CXCR5- no se pudo detectar secreción de IgA o IgG pero si cantidades pequeñas de IgM (**Figura 1A**). A continuación examinamos la capacidad funcional de las subpoblaciones de células Thf: Thf-Th1, Thf-Th2 y Thf-Th17 aisladas de sangre periférica a partir de la población de células T CD4+CXCR5+. En cocultivo con células Thf-Th2 o Thf-Th17 autólogas, las células B *naïve* secretaron IgG, IgA e IgM (**Figura 1B**). Por el contrario, las células B *naïve* cocultivadas con células Thf-Th1 no produjeron IgG o IgA detectable, solamente cantidades bajas de IgM (**Figura 1B**). Esto indica, que dentro de la población de células T CD4+CXCR5+ circulantes, sólo las subpoblaciones Thf-Th2 y Thf-Th17, pero no la Thf-Th1, son capaces de inducir maduración de células B *naïve*, lo cual es consistente con los resultados publicados por *Morita et al.* (Morita et al., 2011).



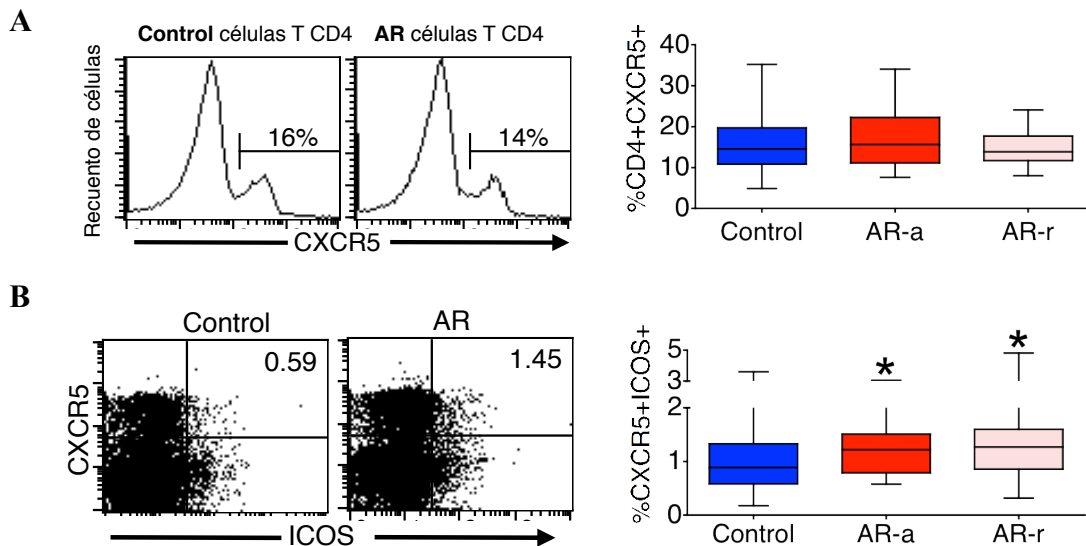
**Figura 1. Capacidad funcional de las células T CD4+CXCR5+ y las subpoblaciones de linfocitos Thf.** Concentración de IgA, IgG e IgM en los sobrenadantes a los 13 días de cocultivo de células B *naïve* CD19+CD27- con células T CD4+CXCR5+ o CD4+CXCR5- autólogas (**A**) o con las subpoblaciones de células Thf (Thf-Th1, Thf-Th2 o Thf-Th17) autólogas (**B**) aisladas de sangre periférica de controles sanos. Los gráficos de barras representan la media aritmética  $\pm$  D.E. de 5 experimentos independientes.

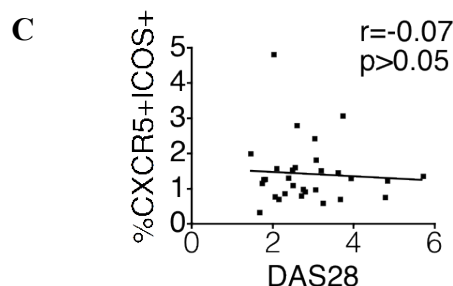


## B.2 FRECUENCIA Y FENOTIPO DE LINFOCITOS Thfc Y DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Thfc EN AR

### B.2.1. Aumento de la frecuencia de linfocitos Thfc en sangre periférica de pacientes con AR

En primer lugar, examinamos la expresión de marcadores fenotípicos de superficie característicos de linfocitos Thfc en células T CD4<sup>+</sup> presentes en sangre periférica de los diferentes grupos de estudio: pacientes con AR con enfermedad activa (AR-a) o inactiva (AR-r) y controles sanos. Es importante destacar que el número absoluto de células T CD4<sup>+</sup> circulantes no fue diferente entre los tres grupos estudiados (media  $\pm$  SEM,  $1.141,0 \pm 142,8 \times 10^3$  células T CD4<sup>+</sup>/ml en AR-a vs  $950,6 \pm 132,3$  en AR-r, vs  $1.024,2 \pm 163,8$  en Control,  $p > 0,1$ ). La frecuencia de células CXCR5<sup>+</sup> circulantes dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> no fue diferente en pacientes con AR-a o pacientes con AR-r en comparación con controles sanos (**Figura 2A**). Por el contrario, la frecuencia de células T circulantes CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>, las cuales son consideradas como células Thfc (Simpson et al., 2010)(Chevalier et al., 2011)(Vinuesa & Cook, 2011), estaba incrementada significativamente tanto en los pacientes con AR-a como en los pacientes con AR-r (**Figura 2B**). Dentro los pacientes con AR, no hubo correlación entre los parámetros de actividad de la enfermedad y la frecuencia de células Thfc CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (**Figura 2C**).

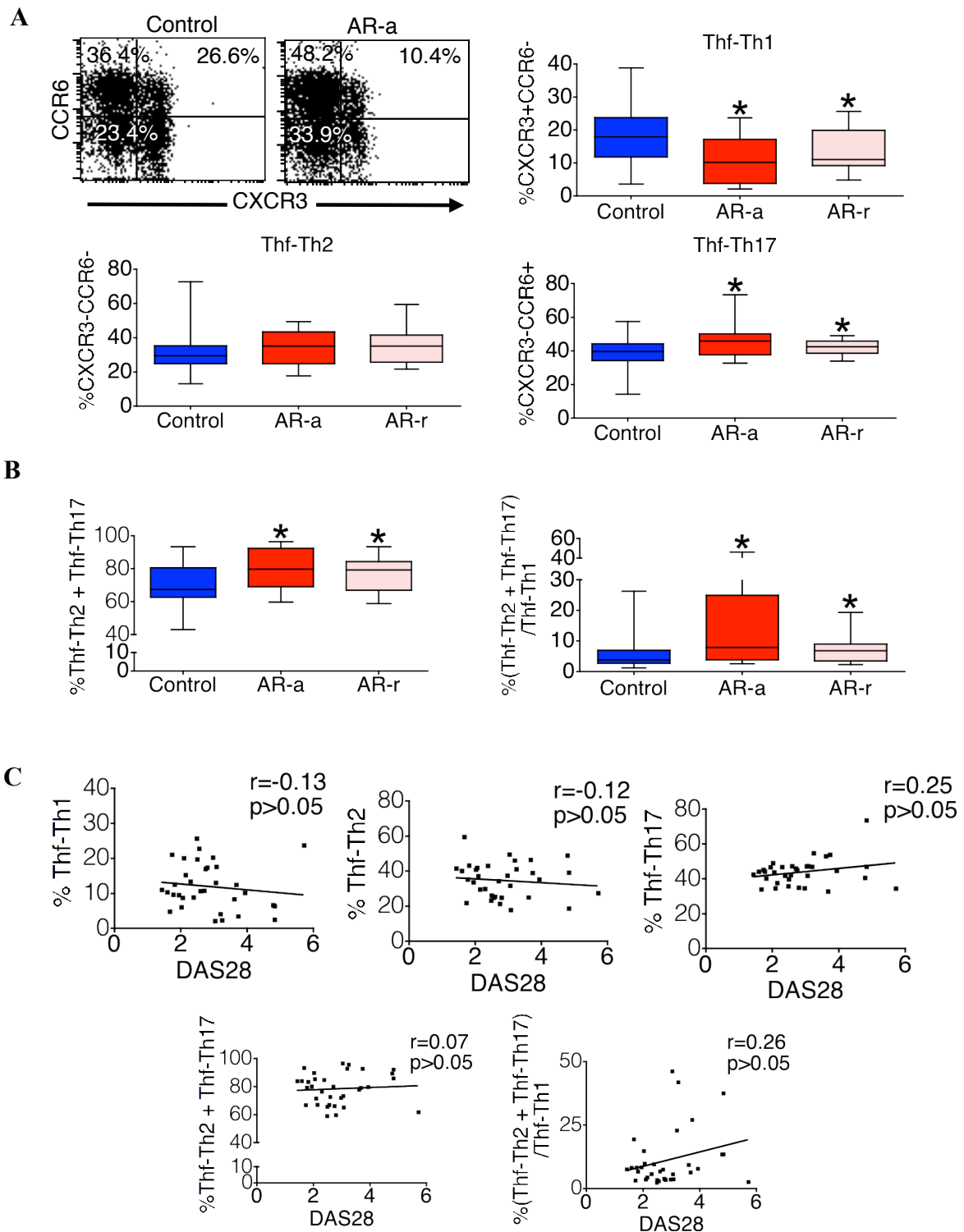




**Figura 2. Frecuencia de células CD4+CXCR5+ y células Thfc CD4+CXCR5+ICOS+ en AR.** A. Histogramas representativos de citometría de flujo de la expresión de CXCR5 en células seleccionadas para CD3 y CD4 (**izquierda**). Frecuencia de células T CD4+CXCR5+ circulantes en pacientes con AR con enfermedad activa (AR-a) o inactiva (AR-r) y en controles sanos (**derecha**). B. Diagramas de puntos representativos que muestran la expresión de ICOS y CXCR5 en células seleccionadas para CD3 y CD4 (**izquierda**). Frecuencia de células Thfc definidas como células T CXCR5+ICOS+, en pacientes AR-a, AR-r y controles (**derecha**). C. Relación de la frecuencia de células Thfc CXCR5+ICOS+ con la actividad de la enfermedad determinada por el índice de actividad DAS28. En A y B, los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil, los valores máximos y mínimos calculados a partir de 17 pacientes con AR-a, 17 pacientes con AR-r y 34 controles sanos. \*  $p < 0,01$  vs Control.

### B.2.2. Equilibrio alterado de las subpoblaciones de células Thfc en pacientes con AR

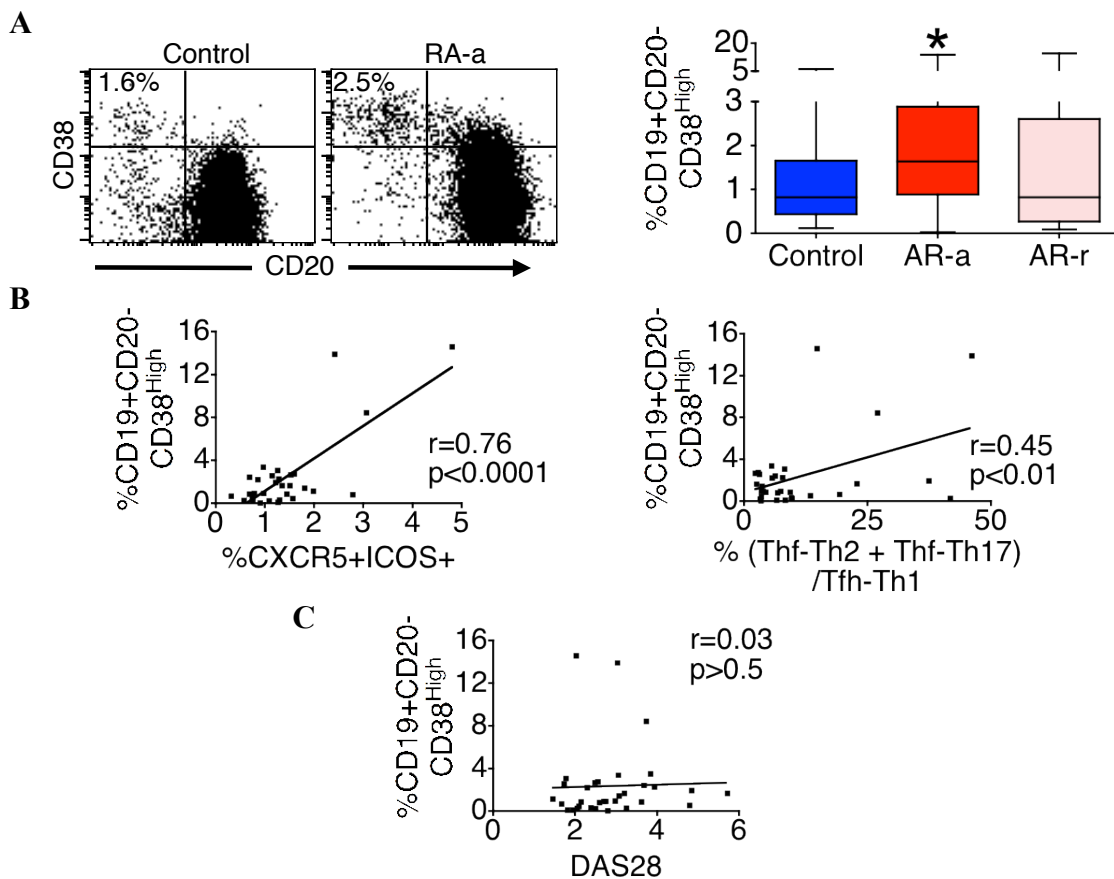
Determinamos la expresión de los marcadores fenotípicos de superficie característicos de las subpoblaciones de linfocitos Thfc descritas por *Morita et al.* (Morita et al., 2011) en células T CD4+ presentes en sangre periférica de pacientes con AR y controles sanos. Tanto los pacientes con AR con enfermedad activa, como inactiva, mostraron una disminución en la frecuencia de células Thf-Th1 circulantes junto con un aumento en la frecuencia de células Thf-Th17, mientras que la frecuencia de células Thf-Th2 tendía a ser elevada, pero no era estadísticamente diferente de los controles sanos (**Figura 3A**). Además, la suma de los porcentaje de células Thf-Th2 y Thf-Th17, y la ratio  $(\text{Thf-Th2} + \text{Thf-Th17}) / \text{Thf-Th1}$  fue significativamente mayor en los pacientes con AR-a o AR-r en comparación con los controles (**Figura 3B**). Es decir, tanto los pacientes con AR-a como los pacientes con AR-r, mostraron un aumento de las subpoblaciones de células Thf con fenotipo ayudador de células B (Thf-Th2 y Thf-Th17). Dentro de los pacientes con AR, no hubo correlación entre los parámetros de actividad de la enfermedad y las frecuencias observadas de las subpoblaciones de linfocitos Thfc, la suma de los porcentaje de células Thf-Th2 y Thf-Th17 o la ratio  $(\text{Thf-Th2} + \text{Thf-Th17}) / \text{Thf-Th1}$  (**Figura 3C**).



**Figura 3. Frecuencia de las subpoblaciones de Thf: Thf-Th1, Thf-Th2 y Thf-Th17 en AR. A.** Diagramas de puntos representativos que muestran la expresión de CXCR3 y CCR6 en células seleccionadas para CD4 y CXCR5. Frecuencia de las subpoblaciones de Thf: Thf-Th1, Thf-Th2 y Thf-Th17 en pacientes con AR-a, AR-r y controles sanos. **B.** Suma de los porcentaje de células Thf-Th2 y Thf-Th17 y ratio (Thf-Th2 + Thf-Th17) / Thf-Th1 en pacientes AR-a, AR-r y controles. **C.** Relación de la suma de los porcentaje de células Thf-Th2 y Thf-Th17 y la ratio (Thf-Th2 + Thf-Th17) / Thf-Th1 con la actividad de la enfermedad determinada por el índice de actividad DAS28. En A y B los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil, los valores máximos y mínimos calculados a partir de 17 pacientes con AR-a, 17 pacientes con AR-r y 34 controles sanos. \*  $p < 0,01$  vs Control.

### B.2.3. Mayor frecuencia de plasmablastos circulantes en pacientes con AR con enfermedad activa

El número absoluto de células circulantes CD19+ no fue diferente en los pacientes con AR con enfermedad activa o inactiva, en comparación con los controles sanos (media  $\pm$  SEM,  $86,65 \pm 13,06 \times 10^3$  células CD19+/ml en AR-a vs  $87,51 \pm 15,78$  en pacientes AR-r vs  $86,70 \pm 9,49$  en Controles). Al mismo tiempo, la frecuencia de plasmablastos circulantes, definida como células B CD19+CD20-CD38<sup>High</sup>, estaba aumentada en pacientes con AR-a, pero no en pacientes con AR-r (**Figura 4A**). Curiosamente, en los pacientes con AR-a, la frecuencia de plasmablastos circulantes se correlacionó positivamente no sólo con la frecuencia linfocitos Thfc CXCR5+ICOS+, sino también con la ratio (Thf-Th2 + Thf-Th17) / Thf-Th1 (**Figura 4B**). Dentro de los pacientes con AR, no hubo correlación entre los parámetros de actividad de la enfermedad y la frecuencia de plasmablastos circulantes (**Figura 4C**).



**Figura 4. Frecuencia de plasmablastos circulantes en AR.** **A.** Diagramas de puntos representativos que muestran la expresión de CD20 y CD38 en células seleccionadas para CD19 (**izquierda**). Frecuencia de plasmablastos circulantes CD19+CD20-CD38<sup>High</sup> en pacientes con AR-a, AR-r y controles sanos (**derecha**). Los diagramas de caja representan la mediana, el rango intercuartil, los valores máximos y mínimos calculados a partir de 17 pacientes con AR-a, 17 pacientes con AR-r y 34 controles sanos. \*  $p < 0,01$  vs Control. **B.** Correlación positiva de la frecuencia de plasmablastos circulantes CD19+CD20-CD38<sup>High</sup> con la frecuencia de células Thfc CXCR5+ICOS+ y con la ratio (Thf-Th2 + Thf-Th17) / Thf-Th1 en pacientes con AR-a. **C.** Relación de la frecuencia de plasmablastos circulantes CD19+CD20-CD38<sup>High</sup> con la actividad de la enfermedad determinada por el índice de actividad DAS28.

## ***DISCUSIÓN***



El objetivo de este trabajo ha sido estudiar diferentes tipos celulares implicados en la AR y su posible papel en la patogenia de la enfermedad. Para ello, hemos realizado diversos tipos de cultivos celulares y estudiado diferentes moléculas, como citoquinas y proteínas de membrana, características de estas poblaciones celulares.

Es interesante estudiar el perfil de expresión de citoquinas y el fenotipo de las células responsables del daño articular, puesto que el conocimiento de los factores implicados en el inicio y perpetuación de la inflamación, puede favorecer el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

### **A. LINFOCITOS Th17 EN LA PATOGENIA DE LA AR**

La importancia de la IL-17 en la patogenia de la AR se ha demostrado en una gran variedad de modelos animales: ratones knockout para IL-17 que desarrollan significativamente menos artritis o el tratamiento con anticuerpos neutralizantes frente a IL-17 o el receptor soluble de IL-17 que alivian la inflamación articular (Nakae et al., 2003)(Lubberts et al., 2004). Por otro lado, estudios previos *in vitro* muestran sólidos y generalizados efectos inflamatorios de la IL-17 en las células de la articulación, señalando que las células Th17 pueden desempeñar un papel importante en la AR (Shahrara et al., 2009)(Sato et al., 2006). Teniendo en cuenta todos estos datos, nuestra hipótesis inicial fue que la frecuencia de células Th17 podría estar aumentada en nuestros pacientes con AR.

En un primer análisis, detectamos una disminución significativa de la frecuencia de células Th17 circulantes en todos los pacientes con ARO como un solo grupo, mientras que los pacientes con AR establecida mostraron frecuencias de Th17 circulantes que no eran diferentes a las de los controles sanos. Inesperadamente, en un segundo análisis tras dividir los pacientes con ARO de acuerdo a la presencia o ausencia de ACPA, comprobamos que sólo los pacientes con ARO ACPA+ mostraban una disminución de la frecuencia de Th17 circulantes, mientras que por el contrario, la frecuencia de las células Th17 circulantes en los pacientes con ARO ACPA- era comparable a la observada en los controles. Es decir, que a pesar de que los pacientes ACPA+ representaban el 45% de nuestra población de pacientes con ARO, su marcada disminución de la frecuencia de Th17 era capaz de reducir los números finales en el grupo total de pacientes con ARO. Al mismo tiempo, la frecuencia de células T CD4+ totales de sangre periférica, células Th1 circulantes y la secreción de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 derivados de linfocitos T CD4+, no fueron diferentes entre los pacientes con ARO y los controles sanos. Es de destacar que la frecuencia de células Th17/Th1 circulantes estaba disminuida en sangre periférica de pacientes con ARO ACPA+ pero no en pacientes con ARO ACPA-, siendo consistente con observaciones recientes que indican que las células dobles productoras IL-17+/IFN $\gamma$ + se originan a partir de células Th17 y no de células Th1 (Annunziato et al., 2007)(Lee et al., 2009).

Nuestra población de sujetos con ARO que nunca había recibido tratamiento con corticosteroides o FAMES no era homogénea en cuanto a la frecuencia de células Th17 circulantes, puesto que se observó una diferencia clara entre los pacientes ARO ACPA+ y ACPA-. Aunque actualmente no hay una explicación evidente para esta observación, si que podemos decir que los datos presentados en este trabajo pueden contribuir a reforzar el concepto de que los pacientes con AR ACPA+ y ACPA- son entidades distintas (Daha & Toes, 2011).

Curiosamente, entre los pacientes con ARO ACPA+, tanto la frecuencia de Th17 como la de Th17/Th1 se correlacionaron negativamente con los títulos de ACPA, lo que refuerza aún más el vínculo entre la baja frecuencia de Th17 y la seropositividad para ACPA. Asimismo, se observó una frecuencia significativamente menor de células Th17 y Th17/Th1 circulantes en los pacientes con ARO que presentaban enfermedad erosiva frente a los pacientes que no presentaban enfermedad erosiva; sin embargo, tras ajustar para la positividad de los ACPA era evidente que este hallazgo estaba vinculado a la fuerte asociación que existe entre la presencia de ACPA y un daño óseo más severo y erosivo en pacientes con AR (Syversen et al., 2010)(Hecht et al., 2015).

Elegimos analizar las células del líquido sinovial como células representativas del foco inflamatorio en la AR. Los linfocitos T del líquido sinovial en AR representan a células T que han llegado a la articulación a través de la sangre periférica y han adquirido un fenotipo activado. Sin embargo, no está claro si la activación de las células T se produce antes de la entrada al tejido, durante la migración transendotelial o en la sinovial (Aarvak & Natvig, 2001). Observamos que cuando comparábamos con sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con AR establecida o de inicio, existía una mayor frecuencia de células Th17 en el líquido sinovial de AR, junto con un aumento de la frecuencia de las células Th17/Th1, lo cual es consistente con estudios previos sobre la frecuencia de células Th17 en líquido sinovial de AR (Shahrara et al., 2008)(Nistala et al., 2010)(Church et al., 2010)(Zizzo et al., 2011), pero discordante con otros (Yamada et al., 2008). Estos resultados sugieren que las células Th17 podrían concentrarse en el foco inflamatorio en la AR. La expresión de CCR6 en las células Th17 sugiere su capacidad para migrar a sitios de inflamación en respuesta a un microambiente inflamatorio a través de la interacción con CCL20 (Acosta-Rodriguez et al., 2007), lo que podría estar relacionado con un aumento de la migración de estas células al foco inflamatorio seguido por el secuestro en la articulación inflamada (Kontinen et al., 1990). El grupo de *Nistala et al.* (Nistala et al., 2010) propone un ciclo de retroalimentación positiva mediante el cual las células Th17 son reclutadas a la articulación, donde se convertirían en células Th17/Th1 en respuesta a la IL-12 local. El IFN $\gamma$  secretado por este tipo celular, a través de la inducción y mantenimiento de la producción local de CCL20, promovería el reclutamiento de más Th17. Este echo demostraría que el enriquecimiento de células Th17/Th1 en el foco inflamatorio puede ser impulsado por un entorno permisivo que promueve la plasticidad de las células Th17.



Esta situación en la que las células Th17 se encuentran acumuladas en la articulación inflamada, podría ser revertida tras el tratamiento: se ha descrito que la terapia con anti-TNF en AR se asocia con un aumento del porcentaje de células Th17 circulantes posiblemente atribuible a una disminución de la migración hacia la membrana sinovial (Aerts et al., 2010). Por otro lado, en un estudio prospectivo longitudinal se demostró que el número de células Th17 en sangre periférica de pacientes con AR aumentaba hasta normalizarse tras el tratamiento con MTX, lo que podría explicarse por la inhibición de la migración a las articulaciones mediada por la disminución de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y expresión de moléculas de adhesión, mediada por MTX (Chalan et al., 2013).

Quisimos examinar también la producción de IL-17 en otras poblaciones celulares, como las células T  $\gamma\delta$ , células T CD8 y células NK, pero observamos que esta citoquina era producida exclusivamente por las células T CD4+ tanto en el líquido sinovial de AR, como en sangre periférica de controles sanos, pacientes con ARo y con AR establecida, lo cual estaba en consonancia con el trabajo publicado por *Shen et al.* (Shen et al., 2009).

La biología de las células Th17 es compleja y no del todo comprendida, lo que podría explicar por qué estudios previos sobre la frecuencia de células Th17 en AR han arrojado resultados contradictorios. Diversos autores han descrito un aumento de la frecuencia de células Th17 circulantes en AR (Gullick et al., 2010)(Shen et al., 2009), mientras que otros observan frecuencias comparables a las mostradas por los controles sanos (Aerts et al., 2010)(Yamada et al., 2008)(Jandus et al., 2008). Por otro lado existen escasos estudios sobre la frecuencia de células Th17 en ARo, y los resultados son igualmente discordantes, hay autores que describen un aumento de la frecuencia de Th17 circulantes en ARo (van Hamburg et al., 2011)(Colin et al., 2010)y otros que describen una disminución de la frecuencia de Th17 circulantes en ARo (Chalan et al., 2013). La razón de las diferencias entre nuestro trabajo y otros estudios en relación a las células Th17 no está clara, aunque es posible que las diferencias en el perfil clínico de los pacientes y los diferentes tratamientos pueden haber contribuido, así como diferencias en las técnicas y los métodos utilizados.

Las diferentes frecuencias de células circulantes Th17 y Th17/Th1 entre pacientes con ARo y pacientes con AR establecida puede sugerir que los mecanismos inmunes que median en las primeras fases de la enfermedad son distintos a los implicados en etapas más avanzadas (Firestein, 2005). Curiosamente, cuando nuestros pacientes con ARo ACPA+ fueron reexaminados un año después de la primera visita, tras haber recibido tratamiento con MTX oral, su frecuencia de células Th17 circulantes ya no era diferente a la de los controles sanos. Esto era evidente no sólo en los pacientes que habían alcanzado la remisión clínica, sino también en los pacientes que tenían una actividad de la enfermedad persistente, lo que sugiere que el tratamiento podría estar jugando un papel importante. Diferentes autores han concluido que la frecuencia de células Th17 en sangre periférica de AR puede ser modificada por el

tratamiento. Como se señaló anteriormente, *Chalan et al.* (Chalan et al., 2013) demostraron en un estudio prospectivo longitudinal, que el número de células Th17 en sangre periférica de pacientes con AR se normalizaba tras el tratamiento con MTX. Por otro lado, *Aerts et al.* (Aerts et al., 2010) describieron que en AR establecida no había un incremento de la frecuencia de células Th17 periféricas, pero la terapia anti-TNF inducía un aumento notable de la producción de IL-17 y de la frecuencia de células Th17 circulantes independientemente de la actividad de la enfermedad. Además, *Notley et al.* (Notley et al., 2008) describieron que en la artritis inducida por colágeno, el bloqueo del TNF daba como resultado una reducción de la gravedad de la artritis, pero inesperadamente, una expansión de la población de células Th17 extraarticulares que habrían adoptado carácter patogénico.

Por último, puesto que la IL-17 contribuye a la cronicidad de la AR mediante el control de numerosos mecanismos celulares, varios ensayos clínicos de fase II sobre la eficacia del bloqueo de la IL-17 en AR han sido publicados recientemente dando lugar a resultados contradictorios (Genovese et al., 2014)(Genovese et al., 2013). Estas inconsistencias podrían explicarse por la plasticidad de las Th17 observada en las articulaciones inflamadas de los pacientes con AR donde las células Th17 son inestables y se convierten en células Th17/Th1 y Th1 lo cual se ve favorecido por el ambiente inflamatoria (Nistala et al., 2010). Asimismo, se están estudiando en estos momentos otras terapias alternativas frente a IL-17, como las terapias combinadas anti-IL-17 y anti-TNF $\alpha$ , anti-IL-17A y anti-IL-17F, las cuales parece que obtienen mejor rendimiento (Benedetti & Miossec, 2014). A la vista de nuestros resultados, las discrepancias podrían estar relacionadas con diferencias en la etapa de la enfermedad o la positividad de los ACPA en los pacientes.

## **B. LINFOCITOS Thf EN LA PATOGENIA DE LA AR**

Aunque la etiología de la AR es desconocida, la asociación de esta enfermedad con autoanticuerpos como el FR y los ACPA y el curso de la enfermedad ha sido ampliamente descrita (Agrawal et al., 2007)(Miriovsky et al., 2010). Es importante destacar que, las células B son la principal fuente de autoanticuerpos y las células Thf ayudan a estas células B a diferenciarse en células productoras de anticuerpos, lo que señala la posible implicación de las células Thf en la patogenia de la AR.

En este trabajo describimos que la población de células T CD4+CXCR5+ es más eficaz en la prestación de ayuda a las células B *naïve* que las células CD4+CXCR5-. En cocultivo con CD4+CXCR5+ y en presencia del superantígeno enterotoxina estafilocócica B, las células B *naïve* se diferencian en plasmablastos y producen Igs a los 13 días, por el contrario, en el cocultivo con células CD4+CXCR5- no se induce el cambio de clase de las Igs y sólo se detectan pequeñas cantidades de IgM, lo cual es consistente con lo descrito en anteriores

estudios (Morita et al., 2011)(Chevalier et al., 2011). Asimismo dentro de la población de células T CD4+CXCR5+ circulantes, solamente las subpoblaciones de células Thfc Thf-Th2 y Thf-Th17, pero no las Thf-Th1, muestran propiedades funcionales de células Thf clásica, teniendo así la capacidad de promover la maduración de las células B *naïve* e inducir el cambio de isotipo, como había sido descrito anteriormente (Morita et al., 2011).

Por otro lado, se observó que no sólo los pacientes con AR con enfermedad activa, sino también los pacientes con AR en remisión, mostraban una mayor frecuencia de las subpoblaciones de células Thfc con fenotipo ayudador de células B (Thf-Th2 y Thf-Th17) y de células Thfc definidas como células T CD4+CXCR5+ICOS+ (Simpson et al., 2010)(Chevalier et al., 2011). La frecuencia aumentada de células T CD4+CXCR5+ICOS+ no era atribuible a un aumento en la presencia de células T activadas en sangre periférica, puesto que aunque el CXCR5 es generalmente regulado positivamente en la activación de células T in vivo (Ansel et al., 1999), el total de células T CD4+CXCR5+ no estaba aumentado en nuestros pacientes con AR. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos sobre la frecuencia de células Thfc en pacientes con AR (Ma et al., 2012)(Wang et al., 2013) pero discordantes con otros (Chakera et al., 2012). Es posible que las diferencias en el perfil clínico de los pacientes y los diferentes tratamientos, puedan haber contribuido a las diferencias entre los distintos estudios.

Este aumento constitutivo de células Thfc en AR parece estar relacionado con el fenotipo de la enfermedad y los mecanismos patogénicos, pero no con la actividad, de modo similar a lo que ocurre en pacientes con LES, Tiroiditis Autoinmune, Miastenia Gravis y dermatomiositis juvenil (Simpson et al., 2010)(Zhu et al., 2012)(Luo et al., 2013)(Morita et al., 2011). *Simpson et al.* (Simpson et al., 2010) describen un aumento de células Thfc CXCR5+ICOS+ en un subtipo de pacientes con LES con enfermedad grave, que no variaba ni con el tiempo, ni con las modificaciones en la actividad de la enfermedad o el tratamiento. Por otro lado, *Morita et al.* (Morita et al., 2011) muestran que en dermatomiositis juvenil, las subpoblaciones de células Thfc Thf-Th2 y Thf-Th17 están sobrerrepresentadas y que existe una estrecha correlación entre la ratio de células Thfc Thf-Th2+Thf-Th17/Thf-Th1 y los indicadores clínicos de gravedad de la enfermedad (erupción cutánea y debilidad muscular). En este contexto, se ha propuesto que el aumento del número de células Thfc, puede ser una característica típica de enfermedades inmunes en humanos (Vinuesa & Cook, 2011). Al mismo tiempo, se ha demostrado una relación causal entre la acumulación de células Thf y la autoinmunidad en ratones sanroque homocigotos para una mutación M199R en el dominio ROQ de Roquin (Roquin<sup>san/san</sup>), una proteína reguladora de la estabilidad del ARNm. Roquin reprime el ARNm postranscripcional de ICOS y la homocigosis para el alelo "san" media la sobreexpresión de ICOS y la generación de células Thf (Yu et al., 2007). Los ratones Roquin<sup>san/san</sup> mostraron un número de células Thf aumentado junto con la formación de CGs aberrantes y la selección positiva de autoanticuerpos patógenos de alta afinidad, lo que daba

como resultado un fenotipo similar al lupus (Linterman et al., 2009)(Yu et al., 2007). Además, suprimiendo la generación de células Thf se impedía el desarrollo de lupus en los ratones Roquin<sup>san/san</sup>, y la transferencia de células Thf de estos ratones inducía la formación espontánea de CGs (Linterman et al., 2009). Por otro lado, se demostró que sujetos con deficiencias en CD40L, ICOS, STAT3, o la cadena  $\beta 1$  del receptor de IL-12 mostraban una formación de CGs gravemente deteriorada, junto con una disminución de células T CD4+CXCR5+ circulantes (Schmitt et al., 2014), lo que refuerza la idea de que la frecuencia de células Thfc es un reflejo del *pool* de células Thf clásica de los órganos linfoides.

Es de destacar que ha sido descrito que entre las células Thfc, el subconjunto Thf-Th17 es el que está significativamente más reducido en todas las inmunodeficiencias anteriormente mencionadas (Vinuesa et al., 2013) y más aumentado en enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren (Li et al., 2012), lo que sugiere más aún su papel de liderazgo en la promoción de la producción de autoanticuerpos. Estos datos indican que el subconjuntos Thf-Th17 puede participar en la respuesta inmune mediada por anticuerpos y que la alta frecuencia de este tipo celular en sangre puede ser un biomarcador para la evaluación de los pacientes con AR. Nuestros resultados apoyan la idea de que la producción de autoanticuerpos es regulada diferencialmente por diferentes subconjuntos de células Thf en pacientes con AR.

Cabe destacar, que la proporción alterada de las subpoblaciones de células Thfc en pacientes con dermatomiositis juvenil y el síndrome de Sjögren, parece estar asociada con la actividad de la enfermedad (Morita et al., 2011)(Li et al., 2012), lo que contrasta con los resultados encontrados en nuestros pacientes con AR. Este hecho sugiere que los mecanismos que conducen a una alteración en la regulación de la diferenciación de los subconjuntos de células Thf pueden ser diferentes en dermatomiositis juvenil, el síndrome de Sjögren y AR.

Interesantemente observamos que mientras que los pacientes con AR activa mostraban un aumento de la frecuencia de plasmablastos circulantes, la frecuencia de plasmablastos circulantes en pacientes con AR en remisión no era diferente a la de los controles sanos. Este dato está en paralelo con observaciones que indican que la respuesta al tratamiento en la AR se asocia con una reducción en los títulos de FR y/o ACPA, mientras que los pacientes con AR que no responden al tratamiento mantienen niveles de anticuerpos comparables a los que se encuentran al inicio (Mikuls et al., 2004)(Bos et al., 2008). Es de destacar que, a pesar de una reducción significativa de los niveles de FR y/o ACPA asociada con la respuesta terapéutica, los pacientes con AR seropositivos rara vez se convierten en seronegativos, lo que indica la persistencia de una alteración autoinmune constitutiva (Mikuls et al., 2004)(Bos et al., 2008).

La sobrerrepresentación de las subpoblaciones de células Thfc Thf-Th2 y Thf-Th17 y la representación insuficiente de células Thf-Th1, sugieren que la regulación general de la diferenciación de células Thf esta alterada en pacientes con AR. Esta alteración en las

subpoblaciones de células Thf, se correlaciona con la frecuencia de plasmablastos en los pacientes con AR activa, por lo que podría representar un biomarcador para evaluar la disregulación de la respuesta de células B en esta enfermedad. No encontramos una razón evidente para el hallazgo de plasmablastos circulantes normales en presencia de proporciones elevadas de los subconjuntos de células Thfc en pacientes con AR en remisión, sólo podemos especular que, en los pacientes que responden al tratamiento y logran la remisión, el tratamiento con FAMEs no biológicos podría estar bloqueando la acción del aumento constitutivo del número de células Thf sobre la biología de células B, impidiendo de este modo la generación de mayores proporciones de plasmablastos. Por el contrario, en los pacientes con AR que no logran una respuesta completa a FAMEs, estos medicamentos podrían no ser capaces de modificar la función de las células Thf. Alternativamente, la generación de plasmablastos a través de la vía extrafolicular (descrita solo en ratones) podría explicar las discordancias entre los números de los subconjuntos de células Thfc y plasmablastos en pacientes con enfermedad activa o en remisión (Sweet et al., 2013) (Weisel et al., 2007).

Actualmente, las estrategias terapéuticas en AR se han centrado en antagonizar citoquinas proinflamatorias e inhibir la producción de autoanticuerpos (Smolen & Steiner, 2003). Dado que las células Thf promueven la formación de CGs y la respuesta humoral, la diana terapéutica frente a las células Thf podría ser valiosa como tratamiento de los pacientes con AR. Aunque en la actualidad no existen estrategias terapéuticas disponibles dirigidas contra las células Thf, hay varias vías disponibles para atacar indirectamente este tipo celular. En el estudio de *Li et al.* (Li et al., 2013) se demostró en un modelo murino de artritis inducida por colágeno, que la vacunación con células T específicas de antígeno inactivas mitiga significativamente la gravedad de la enfermedad y reduce los infiltrados inflamatorios en las articulaciones además de provocar una reducción de la frecuencia células Thfc CXCR5+ICOS+ y de IL-21 en suero. Por otra parte, es bien sabido que las células dendríticas son cruciales para la activación de células Thf y la expresión de CXCR5 y Bcl-6, por lo que una diana terapéutica frente a células dendríticas podría controlar la activación de células Thf durante la patogenia de la AR (Spiering et al., 2015). Asimismo, se ha descrito que los anticuerpos anti-IL-21R o la deficiencia del IL-21R puede controlar la artritis espontánea en ratones K/BxN (Jang et al., 2009), así como reducir los signos clínicos e histológicos de la AR en ratones DBA/1 (Young et al., 2007), lo cual indica que la IL-21 es un objetivo potencial para el tratamiento de la AR.

Posiblemente, la frecuencia de células Thfc, en particular las células CD4+CXCR5+ICOS+ y la ratio (Thf-Th2+Thf-Th17)/Thf-Th1, puede ser valiosa para el diagnóstico y la evaluación de la AR. Nuestros resultados abren una nueva ventana para posibles terapias con inmunomoduladores que regulen las células Thf en pacientes con AR y otras enfermedades autoinmunes.



## ***CONCLUSIONES***





De todo lo expuesto en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con ARo ACPA+ muestran una disminución de la frecuencia de células Th17 y Th17/Th1 circulantes, que asciende hasta los valores observados en los controles sanos tras el inicio del tratamiento con MTX. Por el contrario, los pacientes ARo ACPA- presentan en todo momento frecuencias de células Th17 y Th17/Th1 circulantes comparables a las de los controles sanos.
2. En pacientes con ARo ACPA+, la frecuencia basal de células Th17 circulantes se correlaciona con los títulos de ACPA. Por lo tanto, el porcentaje de células Th17 circulante en ARo puede ser considerado como un marcador de positividad para ACPA.
3. Tanto el aumento de la frecuencia de células Thfc, como la sobrerrepresentación de las subpoblaciones de Thfc con fenotipo ayudador de células B (Thf-Th2 y Thf-Th17), son una característica constitutiva de la AR e independiente de la actividad de la enfermedad. Esto indica que una excesiva generación de células Thf y una dinámica alterada de los CGs, pueden desempeñar un papel en la patogenia de esta enfermedad.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Aarvak, T., Natvig, J.B., 2001. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 3, 13–17. doi:10.1186/ar135
- Ackermann, C., Kavanaugh, A., 2007. Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 1369–1384. doi:10.1517/14728222.11.11.1369
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Napolitani, G., 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639–646. doi:10.1038/ni1467
- Adamopoulos, I.E., Chao, C.-C., Geissler, R., Laface, D., Blumenschein, W., Iwakura, Y., McClanahan, T., Bowman, E.P., 2010. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res. Ther.* 12, R29. doi:10.1186/ar2936
- Aerts, N.E., De Knop, K.J., Leysen, J., Ebo, D.G., Bridts, C.H., Weyler, J.J., Stevens, W.J., De Clerck, L.S., 2010. Increased IL-17 production by peripheral T helper cells after tumour necrosis factor blockade in rheumatoid arthritis is accompanied by inhibition of migration-associated chemokine receptor expression. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 49, 2264–2272. doi:10.1093/rheumatology/keq224
- Agrawal, S., Misra, R., Aggarwal, A., 2007. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA. *Clin. Rheumatol.* 26, 201–204. doi:10.1007/s10067-006-0275-5
- Alamanos, Y., Drosos, A.A., 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4, 130–136. doi:10.1016/j.autrev.2004.09.002
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., Combe, B., Costenbader, K.H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J.M.W., Hobbs, K., Huizinga, T.W.J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T.K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H.A., Moreland, L.W., Naden, R.L., Pincus, T., Smolen, J.S., Stanislawski-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P.P., Upchurch, K.S., Vencovský, J., Wolfe, F., Hawker, G., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581. doi:10.1002/art.27584

- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849–1861. doi:10.1084/jem.20070663
- Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., Cyster, J.G., 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J. Exp. Med.* 190, 1123–1134.
- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31, 315–324.
- Aubart, F., Crestani, B., Nicaise-Roland, P., Tubach, F., Bollet, C., Dawidowicz, K., Quintin, E., Hayem, G., Palazzo, E., Meyer, O., Chollet-Martin, S., Dieudé, P., 2011. High levels of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies are associated with co-occurrence of pulmonary diseases with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 38, 979–982. doi:10.3899/jrheum.101261
- Axtell, R.C., Raman, C., Steinman, L., 2013. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 44, 114–120. doi:10.1007/s12016-011-8296-5
- Balsa, A., Carmona, L., González-Alvaro, I., Belmonte, M.A., Tena, X., Sanmartí, R., EMECAR Study Group, 2004. Value of Disease Activity Score 28 (DAS28) and DAS28-3 compared to American College of Rheumatology-defined remission in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 40–46.
- Banning, M., 2005. The principles of inflammation in the development of rheumatoid arthritis. *Br. J. Nurs. Mark Allen Publ.* 14, 277–283. doi:10.12968/bjon.2005.14.5.17665
- Benedetti, G., Miossec, P., 2014. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 44, 339–347. doi:10.1002/eji.201344184
- Bijlsma, J.W.J., 2012. Disease control with glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 51 Suppl 4, iv9–13. doi:10.1093/rheumatology/kes086

Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., Peter, H.H., Warnatz, K., 2006. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 4927–4932.

Bos, W.H., Bartelds, G.M., Wolbink, G.J., de Koning, M.H.M.T., van de Stadt, R.J., van Schaardenburg, D., Dijkmans, B.A.C., Nurmohamed, M.T., 2008. Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 35, 1972–1977.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., Förster, R., 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1552.

Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., de Waal Malefyt, R., Tangye, S.G., 2007. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 8180–8190.

Burska, A., Boissinot, M., Ponchel, F., 2014. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2014, 545493. doi:10.1155/2014/545493

Campbell, D.J., Kim, C.H., Butcher, E.C., 2001. Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat. Immunol.* 2, 876–881. doi:10.1038/ni0901-876

Carbonell, J., Cobo, T., Balsa, A., Descalzo, M.A., Carmona, L., SERAP Study Group, 2008. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 47, 1088–1092. doi:10.1093/rheumatology/ken205

Casamayor-Palleja, M., Khan, M., MacLennan, I.C., 1995. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J. Exp. Med.* 181, 1293–1301.

Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.L., Miossec, P., 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 409–414.

- Chakera, A., Bennett, S.C., Morteau, O., Bowness, P., Luqmani, R.A., Cornall, R.J., 2012. The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 948218. doi:10.1155/2012/948218
- Chalan, P., Kroesen, B.-J., van der Geest, K.S.M., Huitema, M.G., Abdulahad, W.H., Bijzet, J., Brouwer, E., Boots, A.M.H., 2013. Circulating CD4+CD161+ T lymphocytes are increased in seropositive arthralgia patients but decreased in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis. *PloS One* 8, e79370. doi:10.1371/journal.pone.0079370
- Chen, Z., O'Shea, J.J., 2008. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 41, 87–102. doi:10.1007/s12026-007-8014-9
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., Mackay, C.R., 2011. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 5556–5568. doi:10.4049/jimmunol.1002828
- Chibnik, L.B., Mandl, L.A., Costenbader, K.H., Schur, P.H., Karlson, E.W., 2009. Comparison of threshold cutpoints and continuous measures of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting future rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 36, 706–711. doi:10.3899/jrheum.080895
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., Crotty, S., 2011. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34, 932–946. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.023
- Choy, E.H., Panayi, G.S., 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 344, 907–916. doi:10.1056/NEJM200103223441207
- Church, L.D., Filer, A.D., Hidalgo, E., Howlett, K.A., Thomas, A.M.C., Rapecki, S., Scheel-Toellner, D., Buckley, C.D., Raza, K., 2010. Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor-alpha co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression. *Arthritis Res. Ther.* 12, R184. doi:10.1186/ar3152



- Clavel, C., Nogueira, L., Laurent, L., Iobagiu, C., Vincent, C., Sebbag, M., Serre, G., 2008. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 58, 678–688. doi:10.1002/art.23284
- Colin, E.M., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Mus, A.M.C., van Driel, M., Hazes, J.M.W., van Leeuwen, J.P.T.M., Lubberts, E., 2010. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 132–142. doi:10.1002/art.25043
- Cosmi, L., Cimaz, R., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Borriello, F., Frosali, F., Querci, V., Simonini, G., Barra, G., Piccinni, M.P., Liotta, F., De Palma, R., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2011. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 2504–2515. doi:10.1002/art.30332
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., Berrino, L., Fambrini, M., Caproni, M., Tonelli, F., Lazzeri, E., Parronchi, P., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* 205, 1903–1916. doi:10.1084/jem.20080397
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2011. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 66, 989–998. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02576.x
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V., Angeli, R., Matucci, A., Fambrini, M., Liotta, F., Parronchi, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 222–230.e1–4. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.012
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., Annunziato, F., 2014. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 85, 36–42. doi:10.1002/cyto.a.22348
- Craft, J.E., 2012. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 337–347. doi:10.1038/nrrheum.2012.58

- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., Jacobson, J.M., Brooks, A.D., Crotty, S., Estes, J.D., Pantaleo, G., Lederman, M.M., Haddad, E.K., 2013. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat. Med.* 19, 494–499. doi:10.1038/nm.3109
- Daha, N.A., Toes, R.E.M., 2011. Rheumatoid arthritis: Are ACPA-positive and ACPA-negative RA the same disease? *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 202–203. doi:10.1038/nrrheum.2011.28
- Debets, J.M., Van der Linden, C.J., Dieteren, I.E., Leeuwenberg, J.F., Buurman, W.A., 1988. Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 141, 1197–1201.
- Dobner, T., Wolf, I., Emrich, T., Lipp, M., 1992. Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma. *Eur. J. Immunol.* 22, 2795–2799. doi:10.1002/eji.1830221107
- Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 397–440. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397
- Février, M., Dorgham, K., Rebollo, A., 2011. CD4<sup>+</sup> T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses* 3, 586–612. doi:10.3390/v3050586
- Firestein, G.S., 2005. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: how early is early? *Arthritis Res. Ther.* 7, 157–159. doi:10.1186/ar1780
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356–361. doi:10.1038/nature01661
- Firestein, G.S., Budd, R.C., Gabriel, S.E., McInnes, I.B., O'dell, J.R., 2013. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 9th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Förster, R., Emrich, T., Kremmer, E., Lipp, M., 1994. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 84, 830–840.

- Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M., 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87, 1037–1047.
- Frauwirth, K.A., Thompson, C.B., 2002. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109, 295–299. doi:10.1172/JCI14941
- Gaffen, S.L., 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 556–567. doi:10.1038/nri2586
- Genovese, M.C., Durez, P., Richards, H.B., Supronik, J., Dokoupilova, E., Mazurov, V., Aelion, J.A., Lee, S.-H., Coddling, C.E., Kellner, H., Ikawa, T., Hugot, S., Mpofu, S., 2013. Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 863–869. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201601
- Genovese, M.C., Greenwald, M., Cho, C.-S., Berman, A., Jin, L., Cameron, G.S., Benichou, O., Xie, L., Braun, D., Berclaz, P.-Y., Banerjee, S., 2014. A phase II randomized study of subcutaneous ixekizumab, an anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis patients who were naive to biologic agents or had an inadequate response to tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 1693–1704. doi:10.1002/art.38617
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., Shlomchik, M.J., 2010. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* 11, 535–542. doi:10.1038/ni.1877
- Gravallese, E.M., Harada, Y., Wang, J.T., Gorn, A.H., Thornhill, T.S., Goldring, S.R., 1998. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 152, 943–951.
- Gullick, N.J., Evans, H.G., Church, L.D., Jayaraj, D.M., Filer, A., Kirkham, B.W., Taams, L.S., 2010. Linking power Doppler ultrasound to the presence of th17 cells in the rheumatoid arthritis joint. *PloS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0012516

- Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., Sarmay, G., Krumbholz, G., Neumann, E., Toes, R., Scherer, H.-U., Catrina, A.I., Klareskog, L., Jurdic, P., Schett, G., 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* 122, 1791–1802. doi:10.1172/JCI60975
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132. doi:10.1038/ni1254
- Hecht, C., Schett, G., Finzel, S., 2015. The impact of rheumatoid factor and ACPA on bone erosion in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e4. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206631
- Hochberg, M.C., Johnston, S.S., John, A.K., 2008. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr. Med. Res. Opin.* 24, 469–480. doi:10.1185/030079908X261177
- Honda, K., 2012. IL-22 from T cells: better late than never. *Immunity* 37, 952–954. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.006
- Hot, A., Zrioual, S., Toh, M.-L., Lenief, V., Miossec, P., 2011. IL-17A- versus IL-17F-induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in rheumatoid synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 341–348. doi:10.1136/ard.2010.132233
- Ingegnoli, F., Castelli, R., Gualtierotti, R., 2013. Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis. Markers* 35, 727–734. doi:10.1155/2013/726598
- Jabeen, R., Kaplan, M.H., 2012. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 303–307. doi:10.1016/j.coi.2012.02.001
- Jandus, C., Bioley, G., Rivals, J.-P., Dudler, J., Speiser, D., Romero, P., 2008. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum.* 58, 2307–2317. doi:10.1002/art.23655

- Jang, E., Cho, S.-H., Park, H., Paik, D.-J., Kim, J.M., Youn, J., 2009. A positive feedback loop of IL-21 signaling provoked by homeostatic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell expansion is essential for the development of arthritis in autoimmune K/BxN mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4649–4656. doi:10.4049/jimmunol.0804350
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J.P., 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 3513–3521.
- Katz, Y., Nadiv, O., Beer, Y., 2001. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. *Arthritis Rheum.* 44, 2176–2184.
- King, C., Tangye, S.G., Mackay, C.R., 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 741–766. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090344
- Kleyer, A., Finzel, S., Rech, J., Manger, B., Krieter, M., Faustini, F., Araujo, E., Hueber, A.J., Harre, U., Engelke, K., Schett, G., 2014. Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 854–860. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202958
- Koenders, M.I., Joosten, L. a. B., van den Berg, W.B., 2006. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 65 Suppl 3, iii29–33. doi:10.1136/ard.2006.058529
- Kontinen, Y.T., Pettersson, T., Kemppinen, P., Friman, C., 1990. Spontaneous and in vitro activation of synovial fluid and peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 9, 325–332.
- Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159. doi:10.1038/nri3802
- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., Monneaux, F., 2013. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS One* 8, e75319. doi:10.1371/journal.pone.0075319

- Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., Weaver, C.T., 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92–107. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.005
- Liao, K.P., Alfredsson, L., Karlson, E.W., 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 21, 279–283. doi:10.1097/BOR.0b013e32832a2e16
- Linterman, M.A., Rigby, R.J., Wong, R.K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., Cook, M.C., Walters, G.D., Vinuesa, C.G., 2009. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206, 561–576. doi:10.1084/jem.20081886
- Li, S., Niu, X., Xi, Y., Deng, S., Li, C., Zhao, Q., Chen, G., 2013. T cell vaccination inhibits Th1/Th17/Tfh frequencies and production of autoantibodies in collagen-induced arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 967301. doi:10.1155/2013/967301
- Li, X., Wu, Z., Ding, J., Zheng, Z., Li, X., Chen, L., Zhu, P., 2012. Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 238–244. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.133
- Lubberts, E., Koenders, M.I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J.J., Joosten, L.A.B., van den Berg, W.B., 2004. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50, 650–659. doi:10.1002/art.20001
- Lu, M.-C., Lai, N.-S., Yu, H.-C., Huang, H.-B., Hsieh, S.-C., Yu, C.-L., 2010. Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis factor alpha production. *Arthritis Rheum.* 62, 1213–1223. doi:10.1002/art.27386
- Lundberg, K., Wegner, N., Yucel-Lindberg, T., Venables, P.J., 2010. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 727–730. doi:10.1038/nrrheum.2010.139
- Lundy, S.K., Sarkar, S., Tesmer, L.A., Fox, D.A., 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res. Ther.* 9, 202. doi:10.1186/ar2107

- Luo, C., Li, Y., Liu, W., Feng, H., Wang, H., Huang, X., Qiu, L., Ouyang, J., 2013. Expansion of circulating counterparts of follicular helper T cells in patients with myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 256, 55–61. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.12.001
- Maeno, N., Takei, S., Imanaka, H., Yamamoto, K., Kuriwaki, K., Kawano, Y., Oda, H., 2004. Increased interleukin-18 expression in bone marrow of a patient with systemic juvenile idiopathic arthritis and unrecognized macrophage-activation syndrome. *Arthritis Rheum.* 50, 1935–1938. doi:10.1002/art.20268
- Maggi, L., Cimaz, R., Capone, M., Santarlaschi, V., Querci, V., Simonini, G., Nencini, F., Liotta, F., Romagnani, S., Maggi, E., Annunziato, F., Cosmi, L., 2014. Brief report: etanercept inhibits the tumor necrosis factor  $\alpha$ -driven shift of Th17 lymphocytes toward a nonclassic Th1 phenotype in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 1372–1377. doi:10.1002/art.38355
- Maggi, L., Santarlaschi, V., Capone, M., Rossi, M.C., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., De Palma, R., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Cosmi, L., Annunziato, F., 2012. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 3180–3188. doi:10.1002/eji.201242648
- Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S.E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., Jiao, Z., Xu, H., Lu, L., Wang, S., 2012. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 827480. doi:10.1155/2012/827480
- Mathsson, L., Lampa, J., Mullazehi, M., Rönnelid, J., 2006. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc $\gamma$ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor- $\alpha$  by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res. Ther.* 8, R64. doi:10.1186/ar1926
- McInnes, I.B., Schett, G., 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2205–2219. doi:10.7748/phc2011.11.21.9.29.c8797
- McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 429–442. doi:10.1038/nri2094

- Mikuls, T.R., O'Dell, J.R., Stoner, J.A., Parrish, L.A., Arend, W.P., Norris, J.M., Holers, V.M., 2004. Association of rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis Rheum.* 50, 3776–3782. doi:10.1002/art.20659
- Miller, J.F., Mitchell, G.F., 1968. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 801–820.
- Miriovsky, B.J., Michaud, K., Thiele, G.M., O'Dell, J.R., Cannon, G.W., Kerr, G., Richards, J.S., Johnson, D., Caplan, L., Reimold, A., Hooker, R., Mikuls, T.R., 2010. Anti-CCP antibody and rheumatoid factor concentrations predict greater disease activity in men with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1292–1297. doi:10.1136/ard.2009.122739
- Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jäger, A., Kim, H.-J., Korn, T., Kolls, J.K., Cantor, H., Bettelli, E., Kuchroo, V.K., 2010. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14292–14297. doi:10.1073/pnas.1009234107
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E.M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J., Ueno, H., 2011. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108–121. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Müller, I., Pedrazzini, T., Farrell, J.P., Louis, J., 1989. T-cell responses and immunity to experimental infection with leishmania major. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 561–578. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.003021
- Murdaca, G., Colombo, B.M., Puppo, F., 2011. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern. Emerg. Med.* 6, 487–495. doi:10.1007/s11739-011-0517-7



- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., Iwakura, Y., 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 6173–6177.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2010. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev.* 236, 265–275. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00910.x
- Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., Saigo, K., Morinobu, A., Koshiba, M., Kuntz, K.M., Kamae, I., Kumagai, S., 2007. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 146, 797–808.
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., Wedderburn, L.R., 2010. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14751–14756. doi:10.1073/pnas.1003852107
- Niu, X., Chen, G., 2014. Clinical biomarkers and pathogenic-related cytokines in rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Res.* 2014, 698192. doi:10.1155/2014/698192
- Notley, C.A., Inglis, J.J., Alzabin, S., McCann, F.E., McNamee, K.E., Williams, R.O., 2008. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 205, 2491–2497. doi:10.1084/jem.20072707
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., Dong, C., 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001–1005. doi:10.1126/science.1176676
- O'Shea, J.J., Paul, W.E., 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 327, 1098–1102. doi:10.1126/science.1178334
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L., Leonard, W.J., 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630–1634. doi:10.1126/science.1077002

Panayi, G.S., 2005. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatol. Oxf. Engl.* 44 Suppl 2, ii3–ii7. doi:10.1093/rheumatology/keh616

Panayi, G.S., Corrigall, V.M., Pitzalis, C., 2001. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 27, 317–334.

Pap, T., Claus, A., Ohtsu, S., Hummel, K.M., Schwartz, P., Drynda, S., Pap, G., Machner, A., Stein, B., George, M., Gay, R.E., Neumann, W., Gay, S., Aicher, W.K., 2003. Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. *Arthritis Res. Ther.* 5, R163–173.

Pöllinger, B., Junt, T., Metzler, B., Walker, U.A., Tyndall, A., Allard, C., Bay, S., Keller, R., Raulf, F., Di Padova, F., O'Reilly, T., Horwood, N.J., Patel, D.D., Littlewood-Evans, A., 2011. Th17 cells, not IL-17+  $\gamma\delta$  T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2602–2612. doi:10.4049/jimmunol.1003370

Prevoo, M.L., van 't Hof, M.A., Kuper, H.H., van Leeuwen, M.A., van de Putte, L.B., van Riel, P.L., 1995. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 44–48.

Reparon-Schuijt, C.C., van Esch, W.J., van Kooten, C., Schellekens, G.A., de Jong, B.A., van Venrooij, W.J., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., 2001. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 41–47. doi:10.1002/1529-0131(200101)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0

Romme Christensen, J., Börnsen, L., Ratzer, R., Piehl, F., Khademi, M., Olsson, T., Sørensen, P.S., Sellebjerg, F., 2013. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PloS One* 8, e57820. doi:10.1371/journal.pone.0057820

Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattéi, M.G., Denizot, F., Golstein, P., 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 5445–5456.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712. doi:10.1038/44385

- Santarlaschi, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Querci, V., De Palma, R., Liotta, F., Cosmi, L., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 39, 207–215. doi:10.1002/eji.200838748
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D.J., Takayanagi, H., 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* 203, 2673–2682. doi:10.1084/jem.20061775
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., Moser, B., 2000. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* 192, 1553–1562.
- Schellekens, G.A., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., van de Putte, L.B., van Venrooij, W.J., 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273–281. doi:10.1172/JCI1316
- Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A., van den Hoogen, F.H., Hazes, J.M., Breedveld, F.C., van Venrooij, W.J., 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43, 155–163. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ueno, H., 2014. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* 35, 436–442. doi:10.1016/j.it.2014.06.002
- Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A.M., Pope, R.M., 2008a. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, R93. doi:10.1186/ar2477
- Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A.M., Pope, R.M., 2008b. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, R93. doi:10.1186/ar2477
- Shahrara, S., Pickens, S.R., Dorfleutner, A., Pope, R.M., 2009. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 3884–3891. doi:10.4049/jimmunol.0802246

- Shen, H., Goodall, J.C., Hill Gaston, J.S., 2009. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1647–1656. doi:10.1002/art.24568
- Shmerling, R.H., Delbanco, T.L., 1991. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am. J. Med.* 91, 528–534.
- Simon, M., Girbal, E., Sebbag, M., Gomès-Daudrix, V., Vincent, C., Salama, G., Serre, G., 1993. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called “antikeratin antibodies,” autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 92, 1387–1393. doi:10.1172/JCI116713
- Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Cook, M.C., 2010. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62, 234–244. doi:10.1002/art.25032
- Smolen, J.S., Landewé, R., Breedveld, F.C., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gossec, L., Nam, J., Ramiro, S., Winthrop, K., de Wit, M., Aletaha, D., Betteridge, N., Bijlsma, J.W.J., Boers, M., Buttgereit, F., Combe, B., Cutolo, M., Damjanov, N., Hazes, J.M.W., Kouloumas, M., Kvien, T.K., Mariette, X., Pavelka, K., van Riel, P.L.C.M., Rubbert-Roth, A., Scholte-Voshaar, M., Scott, D.L., Sokka-Isler, T., Wong, J.B., van der Heijde, D., 2014. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 492–509. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204573
- Smolen, J.S., Steiner, G., 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 473–488. doi:10.1038/nrd1109
- Song, Y.W., Kang, E.H., 2010. The pathogenic role of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 5, 651–658. doi:10.2217/ijr.10.62
- Spiering, R., Margry, B., Keijzer, C., Petzold, C., Hoek, A., Wagenaar-Hilbers, J., van der Zee, R., van Eden, W., Kretschmer, K., Broere, F., 2015. DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 4804–4813. doi:10.4049/jimmunol.1400986

- Stewart, J.J., Agosto, H., Litwin, S., Welsh, J.D., Shlomchik, M., Weigert, M., Seiden, P.E., 1997. A solution to the rheumatoid factor paradox: pathologic rheumatoid factors can be tolerized by competition with natural rheumatoid factors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 1728–1738.
- Sugiyama, E., Kuroda, A., Taki, H., Ikemoto, M., Hori, T., Yamashita, N., Maruyama, M., Kobayashi, M., 1995. Interleukin 10 cooperates with interleukin 4 to suppress inflammatory cytokine production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells. *J. Rheumatol.* 22, 2020–2026.
- Suurmond, J., Dorjée, A.L., Boon, M.R., Knol, E.F., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Schuerwegh, A.J.M., 2011. Mast cells are the main interleukin 17-positive cells in anticitrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthritis Res. Ther.* 13, R150. doi:10.1186/ar3466
- Sweet, R.A., Cullen, J.L., Shlomchik, M.J., 2013. Rheumatoid factor B cell memory leads to rapid, switched antibody-forming cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 1974–1981. doi:10.4049/jimmunol.1202816
- Syversen, S.W., Gaarder, P.I., Goll, G.L., Ødegård, S., Haavardsholm, E.A., Mowinckel, P., van der Heijde, D., Landewé, R., Kvien, T.K., 2008. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 212–217. doi:10.1136/ard.2006.068247
- Syversen, S.W., Goll, G.L., van der Heijde, D., Landewé, R., Lie, B.A., Odegård, S., Uhlig, T., Gaarder, P.I., Kvien, T.K., 2010. Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 345–351. doi:10.1136/ard.2009.113092
- Takagi, R., Higashi, T., Hashimoto, K., Nakano, K., Mizuno, Y., Okazaki, Y., Matsushita, S., 2008. B cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 186–189.
- Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., Bottomly, K., 1997. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 5956–5963.

- Trouw, L.A., Haisma, E.M., Levarht, E.W.N., van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A., Daha, M.R., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E., 2009. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 60, 1923–1931. doi:10.1002/art.24622
- Ueno, H., Banchereau, J., Vinuesa, C.G., 2015. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* 16, 142–152. doi:10.1038/ni.3054
- Van Bezooijen, R.L., Van Der Wee-Pals, L., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W.G.M., 2002. Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro. *Ann. Rheum. Dis.* 61, 870–876.
- Van den Berg, W.B., Miossec, P., 2009. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 549–553. doi:10.1038/nrrheum.2009.179
- Van Hamburg, J.P., Asmawidjaja, P.S., Davelaar, N., Mus, A.M.C., Colin, E.M., Hazes, J.M.W., Dolhain, R.J.E.M., Lubberts, E., 2011. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum.* 63, 73–83. doi:10.1002/art.30093
- Van Roon, J.A., van Roy, J.L., Gmelig-Meyling, F.H., Lafeber, F.P., Bijlsma, J.W., 1996. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum.* 39, 829–835.
- Van Steendam, K., Tilleman, K., De Ceuleneer, M., De Keyser, F., Elewaut, D., Deforce, D., 2010. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res. Ther.* 12, R132. doi:10.1186/ar3070
- Van Zeben, D., Hazes, J.M., Zwinderman, A.H., Cats, A., van der Voort, E.A., Breedveld, F.C., 1992. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann. Rheum. Dis.* 51, 1029–1035.

- Vermeer, M., Kuper, H.H., Moens, H.J.B., Drossaers-Bakker, K.W., van der Bijl, A.E., van Riel, P.L.C.M., van de Laar, M. a. F.J., 2013. Sustained beneficial effects of a protocolized treat-to-target strategy in very early rheumatoid arthritis: three-year results of the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring remission induction cohort. *Arthritis Care Res.* 65, 1219–1226. doi:10.1002/acr.21984
- Victora, G.D., Nussenzweig, M.C., 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075032
- Vinuesa, C.G., Cook, M.C., 2011. Blood relatives of follicular helper T cells. *Immunity* 34, 10–12. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.006
- Vinuesa, C.G., Fagarasan, S., Dong, C., 2013. New territory for T follicular helper cells. *Immunity* 39, 417–420. doi:10.1016/j.immuni.2013.09.001
- Vossenaar, E.R., Smeets, T.J.M., Kraan, M.C., Raats, J.M., van Venrooij, W.J., Tak, P.P., 2004. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 50, 3485–3494. doi:10.1002/art.20584
- Vossenaar, E.R., Zendman, A.J.W., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J.M., 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 1106–1118. doi:10.1002/bies.10357
- Waler, E., 2007. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 115, 422–438; discussion 439. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_682a.x
- Wang, J., Shan, Y., Jiang, Z., Feng, J., Li, C., Ma, L., Jiang, Y., 2013. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 212–220. doi:10.1111/cei.12162
- Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T.H., 2007. Autoreactive B cells get activated in extrafollicular sites. *Eur. J. Immunol.* 37, 3330–3333. doi:10.1002/eji.200737971
- Wernick, R.M., Lipsky, P.E., Marban-Arcos, E., Maliakkal, J.J., Edelbaum, D., Ziff, M., 1985. IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum.* 28, 742–752.

- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., Zhang, L., Qi, H., 2013. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496, 523–527. doi:10.1038/nature12058
- Yamada, H., Nakashima, Y., Okazaki, K., Mawatari, T., Fukushi, J.-I., Kaibara, N., Hori, A., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., 2008. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1299–1304. doi:10.1136/ard.2007.080341
- Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., Armitage, R.J., 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 5483–5486.
- Young, D.A., Hegen, M., Ma, H.L.M., Whitters, M.J., Albert, L.M., Lowe, L., Senices, M., Wu, P.W., Sibley, B., Leathurby, Y., Brown, T.P., Nickerson-Nutter, C., Keith, J.C., Collins, M., 2007. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 1152–1163. doi:10.1002/art.22452
- Yu, D., Tan, A.H.-M., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D.G., Hutloff, A., Giles, K.M., Leedman, P.J., Lam, K.P., Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., 2007. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 450, 299–303. doi:10.1038/nature06253
- Zhu, C., Ma, J., Liu, Y., Tong, J., Tian, J., Chen, J., Tang, X., Xu, H., Lu, L., Wang, S., 2012. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 943–950. doi:10.1210/jc.2011-2003
- Zizzo, G., De Santis, M., Bosello, S.L., Fedele, A.L., Peluso, G., Gremese, E., Tulusso, B., Ferraccioli, G., 2011. Synovial fluid-derived T helper 17 cells correlate with inflammatory activity in arthritis, irrespectively of diagnosis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 138, 107–116. doi:10.1016/j.clim.2010.10.002
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., 2010. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378. doi:10.1084/jem.20091777



Zvaifler, N.J., 1973. The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. Adv. Immunol. 16, 265–336.



***ANEXO***



Los resultados expuestos en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos, que se incluyen a continuación:

- **Arroyo-Villa I**, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acín P, Nuño L, Bonilla-Hernán MG, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Frequency of Th17 CD4+ T cells in early rheumatoid arthritis: a marker of anti-CCP seropositivity. PLoS One. 2012;7(8):e42189.
- **Arroyo-Villa I**, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acín P, Bonilla-Hernán MG, Plasencia C, Villalba A, Nuño L, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Arthritis Res Ther. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. 2014 Dec 5;16(6):500.

Durante el desarrollo de este trabajo, el doctorando ha participado en el desarrollo de otras líneas de investigación, que han generado las siguientes publicaciones:

- Benito-Miguel M, García-Carmona Y, Balsa A, Bautista-Caro MB, **Arroyo-Villa I**, Cobo-Ibáñez T, Bonilla-Hernán MG, Pérez de Ayala C, Sánchez-Mateos P, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. PLoS One. IL-15 expression on RA synovial fibroblasts promotes B cell survival. 2012;7(7):e40620.
- Bautista-Caro MB, **Arroyo-Villa I**, Castillo-Gallego C, de Miguel E, Peiteado D, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Decreased Th17 and Th1 cells in the peripheral blood of patients with early non-radiographic axial spondyloarthritis: a marker of disease activity in HLA-B27+ patients. Rheumatology (Oxford). 2013 Feb;52(2):352-62.
- Bautista-Caro MB, **Arroyo-Villa I**, Castillo-Gallego C, de Miguel E, Peiteado D, Plasencia-Rodríguez C, Villalba A, Sánchez-Mateos P, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME. Decreased frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and plasmablasts in ankylosing spondylitis patients Naïve for TNF blockers. PLoS One. 2014 Sep 9;9(9):e107086.